

UNIVERSIDADE DE UBERABA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E PRODUÇÃO
ANIMAL NOS TRÓPICOS (PPGSPAT) – MESTRADO**

LARA BERNARDES BIZINOTO

**ÓLEO DE SEMENTE DE UVA (*Vitis vinifera*) NA CICATRIZAÇÃO DE
FERIDAS CUTÂNEAS EXPERIMENTAIS EM RATOS (*Rattus norvegicus*)**

UBERABA – MG

2023

LARA BERNARDES BIZINOTO

**ÓLEO DE SEMENTE DE UVA (*Vitis vinifera*) NA CICATRIZAÇÃO DE
FERIDAS CUTÂNEAS EXPERIMENTAIS EM RATOS (*Rattus norvegicus*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos da Universidade de Uberaba (Uniube) como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos.

**Orientadora: Profa. Dra. Isabel
Rodrigues Rosado**

**Coorientador: Prof. Dr. Endrigo
Gabellini Leonel Alves**

UBERABA – MG

2023

Catalogação elaborada pelo Setor de Referência da Biblioteca Central UNIUBE

B552o Bizinoto, Lara Bernardes.
Óleo de semente de uva (*Vitis vinifera*) na cicatrização de feridas cutâneas experimentais em ratos (*Rattus norvegicus*) / Lara Bernardes Bizinoto. – Uberaba-MG, 2023.
90 f. : il. Color.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de Uberaba. Programa de Pós-graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos.
Orientadora: Profa. Dra. Isabel Rodrigues Rosado.
Coorientador: Prof. Dr. Endrigo Gabellini Leonel Alves.

1. Medicina veterinária. 2. Animais – Experimentação – Pesquisa. I. Universidade de Uberaba. Programa de Pós-graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos. II. Título.

CDD: 636.0885

LARA BERNARDES BIZINOTO

ÓLEO DE SEMENTE DE UVA (*Vitis vinifera*) NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS
CUTÂNEAS EXPERIMENTAIS EM RATOS (*Rattus norvegicus*)

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos do Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos da Universidade de Uberaba.

Área de concentração: Sanidade e Produção Animal nos Trópicos

Aprovada em: 22/03/2023

BANCA EXAMINADORA:



Profª. Drª. Isabel Rodrigues Rosado - Orientadora
Universidade de Uberaba



Prof. Dr. Ian Martin
Universidade de Uberaba



Prof. Dr. Rodrigo dos Santos Horta
Universidade Federal de Minas Gerais

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Angela Rita Bernardes Bizinoto e Paulo César Bizinoto, por sempre acreditarem e dar suporte à todas as minhas escolhas.

Aos meus familiares e amigos por todo o incentivo.

A Prof^a. Dra. Isabel Rodrigues Rosado, minha orientadora, e Prof. Dr. Endrigo Gabellini Leonel Alves, coorientador, por toda paciência, disponibilidade, ensinamentos cooperação e dedicação com esse projeto.

Ao Prof. Dr. Ian Martin por sempre se fazer disposto a me ajudar.

Aos professores da pós-graduação, Renato Linhares Sampaio, Rodrigo Supranzetti de Rezende e Maurício Scoton Igarasi por compartilharem seu conhecimento.

A professora Jankerle Neves Boeloni e professor Gilberto Antônio Borges, por dedicarem seu tempo a este projeto.

As amigas e colegas de mestrado, Fernanda Oliveira Soares e Mylena Martins Coelho, pelo auxílio, companheirismo, e por dividirem essa trajetória comigo.

Aos alunos de Iniciação Científica, Vinícius Fagundes dos Santos e Pedro Henrique Cardoso Fideles, por toda ajuda.

As técnicas de laboratório, Vanessa Beatriz Freitas Alves e Roane Cristina Sousa Castro, pela paciência, disponibilidade e auxílio durante todos esses meses.

As secretárias do programa de mestrado, Lanamara Batista Gomes e Flávia Michele da Silva, por todo o carinho.

A Universidade de Uberaba, cuja os recursos financeiros e infraestrutura permitiram a execução desse projeto.

A FAPEMIG e CAPES-PROSUP pela concessão das bolsas de estudo.

E, por fim, meu respeito e agradecimento a todos os animais desse projeto.

APOIO FINANCEIRO

Esse estudo foi desenvolvido com apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Universidade de Uberaba (Uniube).

RESUMO

A pele é um órgão do corpo cuja principal função é impedir o contato interno do organismo com agentes do meio externo. Entretanto, como este tecido tem função de barreira, ele é vulnerável a sofrer lesões. O reparo dessas lesões é chamado de cicatrização, processo que tem como objetivo restaurar a função normal e primária da pele. O óleo de semente de uva possui diversas funções que podem auxiliar na cicatrização, entre elas a ação antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana. Dessa forma, esse estudo buscou realizar uma revisão de literatura narrativa acerca dos princípios no tratamento de feridas e avaliar o efeito do óleo de semente de uva na cicatrização de feridas cutâneas experimentais em ratos. Foram utilizados 48 *Rattus norvegicus* divididos em dois grupos experimentais: grupo controle (n=24) - animais não tratados; e grupo uva (n=24) - animais tratados com óleo de semente da uva. Todos os animais foram submetidos a ressecção cirúrgica de dois segmentos completos de pele no formato circular com 12 mm de diâmetro, um realizado na região dorsal interescapular e o outro 30 mm caudal ao primeiro. Após o procedimento cirúrgico as feridas foram limpas com solução fisiológica uma vez ao dia até os tempos de avaliação. Nos animais do grupo controle não foram feitas aplicações de medicamentos. Nos animais do grupo uva foi depositado 100 microlitros do óleo de semente da uva sobre as feridas uma vez ao dia até os tempos de avaliação. As eutanásias foram realizadas aos 3, 7, 14 e 21 dias após o procedimento de indução das feridas, em 6 animais de cada grupo para avaliação macroscópica da ferida, mensuração da área da ferida e potencial de contração; avaliação histológica: histomorfometria de células inflamatórias, epitelização, angiogênese, tecido de granulação, deposição de colágeno, crostas, fibroplasia e porcentagem da área de colágeno; imunocoloração do VEGF; e teste mecânico de tração. Os resultados do óleo de semente de uva mostraram menor escore de crostas na análise macroscópica e histológica ao 7º dia de avaliação; maior escore de deposição de colágeno na análise histológica ao 14º dia, juntamente com maior área de colágeno no 3º e 14º dia; maior densidade integrada de pixels do VEGF na análise imuno-histoquímica no 7º dia de avaliação; e maior qualidade do tecido reparado no teste mecânico de tração ao 21º dia. De uma forma geral, conclui-se que o óleo de semente de uva foi benéfico na cicatrização de feridas cutâneas experimentais em ratos.

Palavras-chave: lesões cutâneas, óleo essencial, pele, reparação tecidual

ABSTRACT

The skin is an organ of the body whose main function is to prevent internal contact of the organism with agents of the external environment. However, as this tissue has barrier function, it is vulnerable to suffering injuries. The repair of these lesions is called healing, a process that aims to restore the normal and primary function of the skin. Grape seed oil has several functions that can aid in healing, including antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial action. Thus, this study aimed to conduct a narrative literature review on the principles in wound treatment and to evaluate the effect of grape seed oil on the healing of experimental skin wounds in rats. Forty-eight *Rattus norvegicus* were divided into two experimental groups: control group (n=24) - animals not treated; and grape group (n=24) - animals treated with grape seed oil. All animals were submitted to surgical resection of two complete segments of skin in circular shape with 12 mm in diameter, one performed in the interscapular dorsal region and the other 30 mm caudal at the first. After the surgical procedure, the wounds were cleaned with saline solution once a day up to the evaluation times. In the animals of the control group no drug applications were made. In the animals of the grape group 100 microlitres was deposited over the wounds once a day up to the evaluation times. Euthanasia was performed at 3, 7, 14 and 21 days after the wound induction procedure in 6 animals of each group and evaluated for macroscopic evaluation of the wound, measurement of wound area and contraction potential; histological evaluated: histomorphometry of inflammatory cells, epithelialization, angiogenesis, granulation tissue, collagen deposition, crusts, fibroplasia and percentage of collagen area; VEGF immunostaining; and mechanical tensile test. The results of grape seed oil showed lower crust score in macroscopic and histological analysis on the 7th day of evaluation; higher deposition collagen score in histological analysis on the 14th day of evaluation, with higher collagen area on the 3rd and 14th day; higher integrated density of VEGF pixels in immunohistochemical analysis on the 7th day of evaluation; and higher quality of tissue repaired in the mechanical tensile test at the 21st day. In general, it is concluded that grape seed oil was beneficial in the healing of experimental skin wounds in rats.

Keywords: skin lesions, essential oil, skin, tissue repair

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fotografia após procedimento cirúrgico (dia 0) de ressecção de dois segmentos completos de pele de formato circular com 12 mm de diâmetro, sendo um realizado na região dorsal interescapular e o outro 30 mm caudal ao primeiro em ratos (*Rattus norvegicus*) pertencentes ao grupo não tratado (A) e tratado com óleo de semente de uva (B)..... 51

Figura 2 – Fotografia das amostras de pele colhidas no 21º dia após a lesão, de formato retangular, com 70 mm de comprimento por 20 mm de largura colhidas da região dorsal no sentido transversal do eixo longitudinal do animal, sendo que uma delas foi centralizada na lesão/cicatriz (A) e uma na pele íntegra. Antes do início do teste mecânico, foram recortadas a fim de proporcionar-lhes uma conformação de ampulheta, cujo centro apresentasse 2 mm de largura (B). Amostras posicionadas na máquina universal de ensaios, uma delas centralizada na lesão/cicatriz (C) e outra na pele íntegra (D)..... 57

Figura 3 – Fotografias obtidas durante a análise macroscópica das feridas cutâneas experimentais em ratos não tratados (controle) e tratados com óleo de semente de uva (uva) aos 3, 7, 14 e 21 dias após a lesão. Observar presença de crostas no 3 e 7º dia (A, B e C); presença de tecido de granulação (D, E e F); processo cicatricial avançado a partir do 14º dia (E, F e G); epitelização completa no 21º dia (H). Paquímetro utilizado como referência para calibrar a distância entre as duas feridas (30mm). 59

Figura 4 - Mediana e distância interquartilica dos escores obtidos na avaliação macroscópica de feridas experimentais em ratos não tratados (controle) e tratados com óleo de semente de uva (uva) aos 3, 7, 14 e 21 dias após a lesão. * Diferem pelo teste não paramétrico Mann-Whitney ($p<0,05$)..... 60

Figura 5 - Média e desvio padrão da área (mm) das feridas experimentais em ratos não tratados (controle) e tratados com óleo de semente de uva (uva) mensuradas no dia do procedimento cirúrgico (dia 0) e no 3º, 7º, 14º e 21º dia após a lesão. * Diferem pelo teste T não pareado ($p<0,05$). 61

Figura 6 - Média e desvio padrão do potencial de contração (%) das feridas experimentais em ratos não tratados (controle) e tratados com óleo de semente de uva (uva) aos 3, 7, 14 e 21 dias após a lesão. * Diferem pelo teste T não pareado ($p<0,05$). 62

- Figura 7** – Fotografia de cortes histológicos obtidos após realização de feridas experimentais em ratos não tratados (controle) e tratados com óleo de semente de uva (uva) aos 3, 7, 14 e 21 dias após a lesão. Observar presença de crostas (seta) no 3 e 7º dia (A, B, C e D); fibras colágenas no 14º dia (E e F); epitelização avançada no 21º dia (G e H). Hematoxilina e eosina. Aumento de 4x (A, B, C, D, G e H) e 10x (E e F).. 64
- Figura 8** - Mediana e distância interquartílica dos escores obtidos na avaliação histológica com hematoxilina-eosina de feridas experimentais em ratos não tratados (controle) e tratados com óleo de semente de uva (uva) aos 3, 7, 14 e 21 dias após a lesão. *Diferem pelo teste não paramétrico Mann-Whitney ($p<0,05$). 66
- Figura 9** - Fotografia de cortes histológicos obtidos após realização de feridas experimentais em ratos não tratados (controle) e tratados com óleo de semente de uva (uva) aos 3, 7, 14 e 21 dias após a lesão. Observar fibras colágenas coradas em azul. Tricrômico de Masson. Aumento de 4x. 67
- Figura 10** - Mediana e distância interquartílica dos escores obtidos na avaliação histológica com tricrômico de masson de feridas experimentais em ratos não tratados (controle) e tratados com óleo de semente de uva (uva) aos 3, 7, 14 e 21 dias após a lesão. *Diferem pelo teste não paramétrico Mann-Whitney ($p<0,05$). 68
- Figura 11** - Média e desvio padrão da área do colágeno (%) das feridas experimentais em ratos não tratados (controle) e tratados com óleo de semente de uva (uva) aos 3, 7, 14 e 21 dias após a lesão. * Diferem pelo teste T não pareado ($p<0,05$).. 69
- Figura 12** - Fotografia de cortes histológicos de feridas experimentais em ratos não tratados (controle) e tratados com óleo de semente de uva (uva) aos 3, 7 e 14 dias após a lesão, submetidos a marcação com anticorpo anti-VEGF. Observar imunomarcação da proteína nos queratinócitos (seta) de forma acentuada (D), moderada (A, B, C e F) e discreta (E). Hematoxilina e DAB. Aumento de 40x. 70
- Figura 13** - Fotografia de cortes histológicos de feridas experimentais em ratos não tratados (controle) e tratados com óleo de semente de uva (uva) aos 3, 7 e 14 dias após a lesão, submetidos a marcação com anticorpo anti-VEGF. Observar imunomarcação da proteína nas células endoteliais (seta curva) e células do tecido conjuntivo (seta) de forma

acentuada (D), moderada (A, B, C e F) e discreta (E). Hematoxilina e DAB. Aumento de 40x. 71

Figura 14 - Média e desvio padrão da densidade integrada de pixels (milhões) do VEGF das feridas experimentais em ratos não tratados (controle) e tratados com óleo de semente de uva (uva) aos 3, 7 e 14 dias após a lesão. *Diferem pelo teste T não pareado ($p<0,05$). 72

Figura 15 - Média e desvio padrão da tensão (MPa) das peles íntegras e com lesão em amostras cutâneas após reparação de feridas experimentais em ratos não tratados (controle) e tratados com óleo de semente de uva (uva) no 21º dia após a lesão através do teste mecânico de tração. * Diferem pelo teste T pareado e não pareado ($p<0,05$). 74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação utilizada para avaliação macroscópica de feridas experimentais em ratos não tratados (controle) e tratados com óleo de semente de uva aos 3, 7, 14 e 21 dias após a lesão.	52
Tabela 2 - Classificação utilizada para a análise histológica de feridas experimentais em ratos não tratados (controle) e tratados com óleo de semente de uva aos 3, 7, 14 e 21 dias após a lesão.	54
Tabela 3 - Mediana e distância interquartílica dos escores obtidos na avaliação macroscópica de feridas experimentais em ratos não tratados (controle) e tratados com óleo de semente de uva (uva) aos 3, 7, 14 e 21 dias após a lesão.	60
Tabela 4 - Média e desvio padrão da área (mm) das feridas experimentais em ratos não tratados (controle) e tratados com óleo de semente de uva (uva) mensuradas no dia do procedimento cirúrgico (dia 0) e no 3º, 7º, 14º e 21º dia após a lesão.	61
Tabela 5 – Média e desvio padrão do potencial de contração (%) das feridas experimentais em ratos não tratados (controle) e tratados com óleo de semente de uva (uva) aos 3, 7, 14 e 21 dias após a lesão.	62
Tabela 6 - Mediana e distância interquartílica dos escores obtidos na avaliação histológica com hematoxilina-eosina das feridas experimentais em ratos não tratados (controle) e tratados com óleo de semente de uva (uva) aos 3, 7, 14 e 21 dias após a lesão.	65
Tabela 7 - Mediana e distância interquartílica dos escores obtidos na avaliação histológica com o tricrômico de masson das feridas experimentais em ratos não tratados (controle) e tratados com óleo de semente de uva (uva) aos 3, 7, 14 e 21 dias após a lesão.	68
Tabela 8 - Média e desvio padrão da área do colágeno (%) das feridas experimentais em ratos não tratados (controle) e tratados com óleo de semente de uva (uva) aos 3, 7, 14 e 21 dias após a lesão	69

Tabela 9 - Média e desvio padrão da densidade integrada de pixels (milhões) do VEGF das feridas experimentais em ratos não tratados (controle) e tratados com óleo de semente de uva (uva) aos 3, 7 e 14 dias após a lesão. 72

Tabela 10 - Média e desvio padrão da tensão (MPa) das peles íntegras e com lesão em amostras cutâneas após reparação de feridas experimentais em ratos não tratados (controle) e tratados com óleo de semente de uva (uva) no 21º dia após a lesão através do teste mecânico de tração. 73

LISTA DE ANEXOS

ANEXO I: Comitê de Ética em Experimentação Animal	86
ANEXO II: Protocolo de Histologia	87
ANEXO III: Protocolo de Imuno-histoquímica	88
ANEXO IV: Protocolo de preparo PBS 1%	90

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

EGF	Fator de crescimento epidérmico
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FGF	Fator de crescimento fibroblástico
KGF	Fator de crescimento dos queratinócitos
MPa	Mega Pascal
PC	Potencial de contração
PDGF	Fator de crescimento derivado das plaquetas
TGF-alfa	Fator de crescimento transformador alfa
TGF-beta	Fator de crescimento transformador beta
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: Princípios no tratamento de feridas – parte um	7
INTRODUÇÃO.....	18
REVISÃO DE LITERATURA	18
CONSIDERAÇÕES FINAIS	26
REFERÊNCIAS	27
CAPÍTULO 2: Princípios no tratamento de feridas – parte dois.....	30
INTRODUÇÃO.....	31
REVISÃO DE LITERATURA	31
CONSIDERAÇÕES FINAIS	41
REFERÊNCIAS	41
CAPÍTULO 3: Efeito do óleo de semente de uva (<i>Vitis vinifera</i>) na cicatrização de feridas cutâneas experimentais em ratos (<i>Rattus norvegicus</i>).....	44
INTRODUÇÃO.....	46
OBJETIVOS GERAIS	48
MATERIAL E MÉTODOS.....	49
Normas éticas	49
Animais.....	49
Grupos experimentais	49
Indução da lesão	49
Avaliação macroscópica da ferida.....	51
Avaliação da área da ferida e potencial de contração.....	52
Eutanásia e coleta de amostras	52
Avaliação histológica e imuno-histoquímica	53
Teste mecânico de tração.....	56
Análise estatística	57
RESULTADOS	58

Avaliação macroscópica da ferida.....	58
Avaliação da área da ferida e potencial de contração.....	61
Avaliação histológica e imuno-histoquímica	63
Teste mecânico de tração.....	73
DISCUSSÃO.....	74
CONCLUSÃO.....	80
REFERÊNCIAS	81

CAPÍTULO 1: Princípios no tratamento de feridas – parte um

v. 2, n. 18, 2022

International Journal of Health Science

WOUND TREATMENT PRINCIPLES - PART ONE

Lara Bernardes Bizinoto

Postgraduate Program in Animal Health and
Production in the Tropics

<http://lattes.cnpq.br/9796764351091102>

<https://orcid.org/0000-0003-2409-629X>

Fernanda de Oliveira Soares

Postgraduate Program in Animal Health and
Production in the Tropics.

<http://lattes.cnpq.br/6136278496987143>

<https://orcid.org/0000-0001-7906-7897>

Isabel Rodrigues Rosado

Postgraduate Program in Animal Health and
Production in the Tropics; Clinic: Pulo do
Gato; Universidade de Uberaba

<http://lattes.cnpq.br/5855259434191533>

<https://orcid.org/0000-0001-7819-4253>

Ian Martin

Postgraduate Program in Animal Health and
Production in the Tropics; Universidade de
Uberaba

<http://lattes.cnpq.br/4730020772591126>

<https://orcid.org/0000-0001-6934-8257>

Endrigo Gabellini Leonel Alves

Postgraduate Program in Animal Health and
Production in the Tropics; Clinic: Pulo do
Gato; Universidade de Uberaba

<http://lattes.cnpq.br/4550784508252779>

<https://orcid.org/0000-0001-8524-3949>

All content in this magazine is
licensed under a Creative Commons
Attribution License. Attribution-Non-Commercial-Non-
Derivatives 4.0 International (CC
BY-NC-ND 4.0).



Abstract: The skin is an organ of the body whose main function is to prevent the internal contact of the organism with chemical, physical agents and pathogenic microorganisms present in the external environment. However, as this tissue has a barrier function, it is vulnerable to injury. The repair of these injuries is called scarring, a process consisting of the replacement of injured tissue with fibrous connective tissue, with the aim of restoring the normal and primary function of the skin. This process is considered complex, but essential to maintain the integrity of tissues in the body. It occurs in the same way in all wounds, regardless of their cause, and can be divided into three phases: inflammation, proliferation and remodeling. Some factors influence the healing process, which may be intrinsic or extrinsic to the organism. The objective of this chapter is to detail each phase of healing, as well as the factors that can help or delay this process and the treatment plan according to the particularities of each case.

Keywords: Healing, wounds, skin, tissue repair.

INTRODUCTION

The skin is an organ that performs multiple functions essential to the proper functioning of the body, such as maintaining hydration, participating in the activation of vitamin D, excreting toxins and assisting in thermoregulation (TOTTOLI et al., 2020). However, one of its main functions is to serve as a protective barrier against agents from the external environment (KONDO; ISHIDA, 2010), and due to this, it is a vulnerable tissue to suffer various types of injuries (SINGER; CLARK, 1999).

When the skin suffers some trauma caused by the external environment or is affected by some clinical condition, damage to its structure can occur, giving rise to

cutaneous wounds, which are defined as any interruption of the continuity solution of the body tissues, which may be to a greater or lesser extent. extension (LEITE et al., 2012).

The repair of these lesions, or continuity solutions, consists of the replacement of the injured tissue by a fibrous connective tissue with the objective of restoring the normal and primary function of the skin (HATANAKA; CURI, 2007, TAZIMA et al., 2008). This repair is called healing, a dynamic process to restore the integrity of the skin after an injury, which occurs through the harmonious combination of biochemical and physiological events that begin immediately after the installation of the injury (MANDELBAUM et al., 2003).

The healing process is divided into 3 distinct phases: inflammatory, proliferative, and remodeling. These three phases are not linear and independent, but superimposed (LI et al., 2007). Multiple factors can negatively or positively affect healing, interfering with one or more phases of this process and leading, respectively, to a delay or optimization in tissue repair (GUO; DIPIETRO, 2010). These factors can be divided into intrinsic, when associated with changes in the body itself, and extrinsic, when related to factors external to the body (STANLEY; CORNELL, 2018). These factors will be detailed throughout the chapter.

Therefore, knowledge of the physiological events involved in wound healing, as well as the factors that can negatively or positively influence this process, are of great importance for understanding the injury, the repair phase related, and with that, the best therapy for that moment (TAZIMA et al., 2008).

ANATOMICAL ASPECTS OF THE SKIN

The skin covers the entire body surface, consisting of an epithelial portion of ectodermal origin, the epidermis, and a

conjunctive portion of mesodermal origin, the dermis (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Below the epidermis and dermis is the hypodermis, or subcutaneous tissue, which has the function of adhering the layers above (epidermis and dermis) to underlying organs and deeper structures, allowing the integument to move over them. It is composed of loose connective tissue and when infiltrated by many adipose cells it can be called adipose tissue (BANKS, 1993).

The epidermis consists of five layers known as the basal, spinous, granular, lucid and corneal, and is composed of a keratinized stratified squamous epithelium, which mainly houses keratinocytes; other cells present in the epidermis are melanocytes, Langerhans cells and Merkel cells (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). The epidermis is avascular, and receives the nutrition necessary for its functioning through body fluids that penetrate its deeper layers, and also by capillary permeation through the dermis (MACPHAIL, 2015).

The dermis is composed of a connective tissue that supports the epidermis, and connects it to the subcutaneous tissue or hypodermis; consists of two layers, the papillary, more superficial, and the reticular, deeper (BANKS, 1993). The subcutaneous tissue is composed of collagen, reticular and elastic fibers, fibroblasts, macrophages, lymphocytes, mast cells, blood and lymph vessels, nerves, hair follicles, sweat and sebaceous glands, ducts and smooth muscle fibers.

Due to the composition and characteristics described above, the skin performs multiple functions: it protects the body against dehydration by preventing water loss; acts as a barrier against external attacks; through its sensory nerve endings, it constantly receives information from the external environment that is sent to the central nervous system; participate in the body's

thermoregulation and excretion of various toxins and metabolites; due to the melanin pigment produced by melanocytes, the skin has a protective function against ultraviolet rays; participates in the vitamin D3 activation cycle; and they also have immune system cells that act in the defense against the invasion of microorganisms (LUCAS, 2004, ALVES et al., 2016).

WOUND CLASSIFICATION

There are several types of wounds that can occur, and their knowledge, as well as the stage they are in, are essential for the best choice of treatment in each case and moment. Through history, anamnesis and physical examination, wounds can be classified in relation to their condition (PAVLETIC, 2018), according to depth, degree of contamination, and time of evolution (TAZIMA et al., 2008, SMANIOTTO et al., 2010, PAVLETIC, 2018).

As for depth, they are classified as the superficial or deep. When they do not affect the entire skin structure, affecting only its most superficial layer, the epidermis, they are classified as the superficial wounds, with abrasions belonging to this classification. When the wound reaches deeper layers of the skin, reaching the dermis and even the muscles and bones, it is classified as a deep wound, with incisions, avulsions, perforations and lacerations present in this group (TAZIMA et al., 2008).

According to the degree of contamination, they are classified as clean, clean-contaminated, contaminated and infected. Clean wounds are those performed with minimal trauma, within the aseptic conditions of a surgical unit, following Halsted's principles, and which do not involve the respiratory, oropharyngeal, gastrointestinal and genitourinary tracts, which are naturally contaminated systems. Clean-contaminated procedures are carried out under aseptic conditions, but which

involve the respiratory, oropharyngeal, gastrointestinal and genitourinary tracts, but without any breach of aseptic technique (HEAL et al., 2016). Contaminated wounds are of traumatic origin, which occurred within 4 to 6 hours. Also belonging to this group are surgical wounds in which there was a great breach of aseptic conditions or spillage of gastrointestinal/genito-urinary contents into the cavity, and those that occurred close to contaminated or inflamed areas, but without the presence of purulent content. Finally, infected wounds are of traumatic origin, which occurred more than 4-6 hours ago or which already show visual signs of infection, such as the presence of purulent exudate. They are also classified this way when there are perforations of viscera or organs of the genitourinary system, and when there are more than 100,000 living organisms per gram of tissue (VAN HENGEL et al., 2013, PAVLETIC, 2018).

According to the evolution, they are classified as acute or chronic. Acute wounds are those in which the healing process occurs in an orderly and expected manner, usually within a short period of time, up to 3 weeks. Chronic wounds are those in which their progression does not occur as expected, with a delay in healing. Wounds that take more than 3 months to heal are classified as chronic (SMANIOTTO et al., 2010).

WOUND HEALING

After tissue disruption, the repair process begins, in which a sequence of reactions occurs in order to rebuild the injured tissue. This series of reactions is known as healing, being a physiological and spontaneous process that occurs through three distinct phases: inflammatory, which begins immediately after the injury, and can last for 4 to 6 days; proliferation, starting on the 4th day after tissue injury, extending to the

14th day; and remodeling, starting on the 8th day and extending for more than 1 year (BROUGHTON et al., 2006).

INFLAMMATORY

The first event immediately after the injury is bleeding control, where the affected blood vessels perform vasoconstriction, around 5 to 10 minutes, through stimulation by catecholamines, serotonin, bradykinin and histamine (MACPHAIL, 2015). After that, the vascular endothelium together with the platelets close to the lesion site activate the coagulation cascade, generating the formation of a clot, composed of collagen, platelets, thrombin and fibronectin (CAMPOS et al., 2007). The clot formed serves as a framework for the concentration and storage of cytokines and inflammatory mediators, such as prostaglandins, prostacyclins, thromboxanes and leukotrienes that initiate the inflammatory response. Platelets also secrete important vasoactive substances such as histamine and serotonin and some factors such as epidermal growth factor (EGF), platelet-derived growth factor (PDGF) and transforming growth factor beta (TGF-beta). Due to all these factors, cytokines and vasoactive substances released, blood vessels that were previously constricted dilate to increase chemotaxis, with the aim of guiding defense cells to the site of injury (KONDO; ISHIDA, 2010; STANLEY; CORNELL, 2018).

Neutrophils are the first defense cells attracted to the lesion site, and their migration is stimulated by chemotactic substances such as the complement system, interleukin-1, tumor necrosis factor-alpha, PDGF, TGF-beta, bacteria and others. Its function is to clean the wound bed, releasing proteinases that degrade non-viable and necrotic tissue in the wound bed, phagocytosing bacteria and removing damaged cells and parts of the extracellular matrix that are denatured

or damaged. When their function has been performed, they go into apoptosis (PAVLETIC, 2018).

Monocytes are also attracted to the area of tissue injury by PDGF, elastin, fibronectin, thrombin, and TGF-beta, and subsequently transform into activated macrophages at the site of injury. They come into action after the programmed death of neutrophils and continue the process of cleaning the wound, removing bacteria, contaminants and cellular debris through phagocytosis. They also release proteases that aid in enzymatic wound debridement (KONDO; ISHIDA, 2010, STANLEY; CORNELL, 2018, PAVLETIC, 2018). Macrophages play an essential factor in the transition from the inflammatory to the proliferative phase, as they stimulate and direct in an organized way various growth factors, cells and components of the cellular matrix for the beginning of the second phase (LAWRENCE; DIEGELMANN, 1994).

PROLIFERATION

This phase is composed of three important events that follow the inflammatory phase period: fibroplasia, angiogenesis and re-epithelialization. At this moment, fibroblast proliferation and granulation tissue synthesis occur, which consists of new vessels to be formed, fibroblasts, macrophages, a loose arrangement of collagen, fibronectin and hyaluronic acid, followed by the formation of new capillaries and the proliferation of cells. epithelial cells (TAZIMA et al., 2008, ISAAC et al., 2010).

During fibroplasia, fibroblasts that were at the edge of the wound migrate to the wound site, where they proliferate and synthesize collagen by stimulation of PDGF, EGF and fibroblast growth factor (FGF), secreted by macrophages and platelets. In response to these factors, the fibroblasts begin to synthesize a new provisional extracellular matrix, which

is looser, formed mainly by type III collagen, glycosaminoglycans and fibronectin, which together with the new capillaries that will be formed and other cells present in the bed of the wound, form granulation tissue. Finally, fibroblasts are transformed into myofibroblasts by the stimulation of TGF-beta produced by macrophages, and start wound contraction (BALBINO et al., 2005, BROUGHTON et al., 2006).

Myofibroblasts have intracellular actin and myosin fibers that bind with fibronectin and collagen fibrils that are present in the extracellular matrix. In turn, the collagen fibrils that cross the entire length of the matrix interconnect within the granulation tissue reaching the dermal layer at the edge of the wound. Through all this connection, myofibroblasts are able to apply a traction force through the cells and matrix, causing wound contraction (PAGANELA et al., 2009, PAVLETIC, 2018).

Mainly by the stimulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) caused by keratinocytes, macrophages, fibroblasts, platelets and other endothelial cells present at the edge of the wound, new capillaries begin to be formed in the injured bed, initiating the process of angiogenesis. This development is essential for the synthesis, deposition and organization of a new extracellular matrix (KONDO; ISHIDA, 2010), being responsible not only for the nutrition of the tissue that requires a greater metabolic demand, but also for the increase in the supply of cells, such as macrophages, fibroblasts and stem cells to the wound site (TAZIMA et al., 2008).

Reepithelialization occurs by the proliferation of epithelial cells that were on the edge of the wound, occupying the injured area for protection as a barrier against fluid loss and bacterial invasion. These cells are stimulated by EGF and transforming growth factor alpha (TGF-alpha), produced by activated

macrophages and platelets. The main cells of reepithelialization are the keratinocytes, receiving stimulation from the EGF and TGF- α factors to proliferate and differentiate into a new epithelium. In addition, fibroblasts also act by synthesizing and secreting growth factors exclusively related to keratinocytes (KGF-1, KGF-2), and this way, they also end up stimulating these cells to proliferate (BROUGHTON et al., 2006, LAUREANO; RODRIGUES), 2011).

REFURBISHMENT

The main occurrence of this phase is the deposition of collagen in an organized and successful manner and the replacement of the granulation tissue by a more resistant matrix, composed of type I collagen. During this phase, the production of type III collagen ceases, increasing the production of type I collagen, which is stronger, by TGF- β . This initial type I collagen is thinner than the one existing in skins that have not suffered any type of injury, and therefore, over months to years, this collagen is reabsorbed, synthesized and remodeled again, increasingly resistant, so that at the end of the process, this region that was injured can reach a resistance close to what it was before the tissue injury (KONDO; ISHIDA, 2010).

It is in the remodeling phase that the wound begins to gain strength and strength. The fastest gain in this strength occurs between 7 and 14 days after injury, as collagen accumulates in the wound bed. The wound gains only 20% of the final strength in the first 3 weeks after the injury. Subsequently, there is a slower increase in this strength over time, but it is never regained in its entirety, and only 80% of the original strength can be recovered after healing is complete (MACPHAIL, 2015).

It is important to note that each of these phases does not happen in isolation, and can often overlap with each other. It is common

to find elements from the subsequent phase, or even from the previous phase, at a given moment (AMORIM et al., 2006).

FACTORS THAT INFLUENCE WOUND REPAIR

Even though animals have lower rates of complication in wound repair when compared to humans, in view of issues such as smoking and alcoholism, eventually some factors end up negatively impacting the healing process. These factors can be divided into intrinsic or extrinsic. The intrinsic ones are associated with changes in the body itself, such as low tissue perfusion, accumulation of fluid or infection in the wound bed, endocrinopathies, concomitant diseases, malnutrition and age. Extrinsic factors are related to factors external to the body, such as excessive administration of corticosteroids, and treatment with radiotherapy and chemotherapy (STANLEY; CORNELL, 2018).

INTRINSIC FACTORS

It is necessary that the wound has adequate tissue perfusion for its healing to occur successfully. Low tissue perfusion can happen due to systemic factors such as shock and hypotension, hypovolemia, pain and diabetes mellitus, which must be controlled and resolved in conjunction with wound care (WORTHLEY, 2000, STANLEY; CORNELL, 2018). These factors can alter and decrease the normal blood flow to the wound site, hindering the transport of nutrients and drugs, and impairing the migration of cells, such as those of the immune system, to the wound site, delaying the healing process. et al., 2008).

For a good evolution in the repair process, there can be no devitalized or necrotic tissues and foreign bodies in the wound bed, as it will be stagnant in the inflammatory phase, where the defense cells will constantly try

to clean the wound site (KIRSHEN, et al., 2006). Non-viable tissues and cellular debris must be removed in the early stages of the wound through debridement, which can be performed mechanically or in more severe cases, through surgical debridement (AYELLO; CUDDIGAN, 2004).

The accumulation of fluid in the wound, whether blood or inflammatory fluid, can exert excessive pressure on the wound bed, impairing tissue perfusion and possibly generating ischemia of adjacent tissues, with consequent necrosis. These fluids also serve as a medium for the proliferation of bacteria in the wound bed, in addition to increasing the dead space between tissues and hindering the migration of molecules and cells during the phases of inflammation and proliferation. To avoid the accumulation of these fluids, the wound can be left open, draining constantly in the chosen dressing, or the use of drainage techniques is chosen (STANLEY; CORNELL, 2018). The mode of drainage will mainly depend on the characteristics of the wound and which treatment method was chosen.

The formation of granulation tissue is essential for good healing, but its excessive growth beyond the wound edges prevents the healing sequence, as it blocks the proliferation of epithelial cells and consequent epithelialization (WALDRON; ZIMMERMAN-POPE, 2003). This is especially important in equids, as wounds that occur on the distal parts of the limbs, when compared to the upper part, place greater tension on the skin. This factor leads to a reduced epithelialization rate and consequent exuberant growth of granulation tissue (WILMINK; VAN WEEREN, 2004).

Another factor of great impact in the delay of wound healing is the presence of infection at the wound site. Skin wounds are susceptible to bacteria colonizing their tissues, as the primary protective barrier established by

the intact skin has been lost (EDWARDS; HARDING, 2004). The colonization of the wound by microorganisms ends up stimulating the persistence of the inflammatory phase (JONES et al., 2004), which impairs the evolution of the repair process and prevents the wound from healing (BUCKNALL, 1980).

Some of the changes that are caused by infection at the wound site are the increased release of pro-inflammatory cytokines, caused by the release of endotoxins by bacteria, generating an exacerbated and harmful inflammatory response to the wound. There is also an increase in the production of reactive oxygen specimens by the release of cytotoxic enzymes, causing great tissue damage at the site of injury because they are capable of damaging nucleic acids, lipids, proteins and DNA. In addition, they lead to a greater consumption of complement system proteins, causing a decrease in chemotaxis and consequent decrease in the action of leukocytes and macrophages in the wound bed (ROBSON et al., 1990, VALKO et al., 2007, STANLEY; CORNELL, 2018).

And not only the inflammatory phase is affected, it can extend to the proliferative phase. Due to the release of endotoxins, proteases and other enzymes, keratinocyte migration is impeded, fibroblast proliferation slows down, collagen production becomes disorganized and granulation tissue becomes friable. In addition, components present in the bacterial wall can interfere with VEGF expression and consequent proliferation of endothelial cells, impairing the formation of new vessels and blood supply to the wound (POWER et al., 2001).

Malnutrition directly affects tissue repair. Malnourished animals with low plasma protein may have delayed healing generated by a reduction in wound strength (MACPHAIL, 2015), which is linked to decreased action of fibroplasia and collagen production. In

addition, glucose deficiency impairs the functioning of cells, affecting fibroblasts and defense cells, such as neutrophils, decreasing their action during the healing phases (PAVLETIC, 2018).

Still in relation to nutritional diseases, hepatic alterations resulting from inadequate diets can alter the course of wound hemostasis, by causing a deficiency of clotting factors that help in clot formation. This is a very important factor that helps to initiate the inflammatory phase (MACPHAIL, 2015).

Finally, older age can impair all stages of healing. The inflammatory phase becomes exacerbated as there is an increase in the stimulation of pro-inflammatory cytokines and the migration of inflammatory cells to the wound when the animal is aged. There is also a delay in epithelialization due to decreased migration and proliferation of epithelial cells, and reduced proliferation of fibroblasts, decreasing the rate of extracellular matrix production (ASHCROFT et al., 2002).

EXTRINSIC FACTORS

Immunosuppression resulting from the use of chemotherapy and radiotherapy, and the excessive administration of glucocorticoids negatively affect all phases of healing (STANLEY; CORNELL, 2018).

Corticosteroids reduce vascular permeability, inhibit macrophage migration and fibroblast proliferation, delay angiogenesis, and significantly decrease the synthesis and deposition of type I and III collagen, first delaying the inflammatory phase of the wound and thereby affecting subsequent phases. They also increase the chances of infection at the wound site (NUUTINEN et al., 2003, PAVLETIC, 2018).

Radiation therapy can inhibit wound healing depending on the dose and exposure time. Due to the principle of modifying DNA and RNA, it affects cell division, causing a

decrease in epithelialization, destruction of fibroblasts, with a consequent reduction in collagen synthesis. There is also a decrease in the formation of new capillaries, leading to a restriction of blood supply (HOSGOOD, 2003, MACPHAIL, 2015).

Some chemotherapeutic agents interfere with the action of vitamin B6, B12, folic acid, ascorbic acid, zinc and iron metabolism. It is necessary to monitor the animal that makes prolonged use of these drugs, as it can interfere with the animal's nutrition (PAVLETIC, 2018).

PRINCIPLES IN WOUND TREATMENT

The choice of a wound care plan must take into account the extent of the wound and the degree of local contamination. In the evaluation of the extension, the area, the depth and the tissues that were affected must be considered, as well as the factors that can interfere in the healing process (REITER, 1995).

Wounds can be closed immediately after injury, characterizing treatment by first intention or primary closure; they can be left open, for closure from the inside out with the formation of granulation tissue, followed by epithelialization and contraction of the wound, called in this case, treatment by second intention; or the lesion can be treated initially openly until the formation of granulation tissue and wound disinfection, and be closed later by simple sutures or reconstructive surgeries, characterizing the treatment by third intention or tertiary closure (HOSGOOD, 2018).

TREATMENT BY FIRST INTENTION OR PRIMARY CLOSURE

It concerns the direct closure of the wound (PAVLETIC, 2018), mainly obtained by the use of sutures, however, skin staplers, adhesives or clips can be used (MURTHA et

al., 2006). This treatment is indicated in cases of clean and clean-contaminated wounds. It is not indicated for wounds with devitalized tissue, excess cellular debris, considerable tissue loss, visible tissue contamination or the presence of exudate (FAHIE, 2018). Another parameter to be considered is the time elapsed between the occurrence of the injury and its treatment, which must not exceed 6 hours (GOTTRUP, 1999, MACPHAIL, 2015). The success of the procedure depends on wide shaving around the wound, adequate antisepsis of the bed and adjacent regions and a good approximation of the wound edges, avoiding tension during closure (TOBIAS, 2010).

Treatment by first intention can still be applied in cases of wound occurrence for more than 6 hours or where there are local factors that increase the risk of wound contamination. This is only indicated if the wound has adequate characteristics for closure, such as absence of infection, appearance of tissue vitality, good bed antisepsis, successful debridement. It is noteworthy that in these cases the use of systemic antibiotics is mandatory until the wound is healed (FAHIE, 2018).

Closed wounds with the presence of contamination, necrotic tissue, excessive tension or inadequate abolition of dead space are very susceptible to dehiscence, additional tissue loss, and necrosis from increased tissue tension. When there is dehiscence, it is indicated that the wound receives appropriate treatment and is subsequently treated by second or third intention (MACPHAIL, 2015). When the wound presents infection but there is no dehiscence, the sutures must be removed to allow the drainage of the exudate and the cleaning of the bed, and afterwards the wound must also be treated in an open way (VERMEULEN et al., 2004).

Treatment by first intention provides

simpler postoperative care, less extensive and labor-intensive dressings, faster healing process, less discomfort and pain, less scarring, greater protection of structures underlying the wound bed and more pleasant aesthetic results. Therefore, the use of closure by first intention brings greater benefits to the patient and must be preferred when the characteristics of the wound allow the use of this technique (FAHIE, 2018).

TREATMENT BY SECOND INTENTION OR SECONDARY CLOSURE

Treatment by second intention is indicated for contaminated wounds that do not allow primary closure and that are not extensive enough to warrant surgical intervention to close them. This treatment consists of letting the wound heal openly, through the formation of granulation tissue, epithelialization and contraction of the injured bed (HOSGOOD, 2018). It is indicated for traumatic wounds with considerable tissue loss, which occurred more than 6 to 8 hours, with the presence of visible contamination or infection, or for those that are at high risk of becoming infected, 2015). The second intention is performed in cases where treatment by first intention is contraindicated. Also suitable for this type of treatment are wounds or skin defects that cannot be closed properly using surgical methods, usually in areas of great tension, without loose skin to facilitate primary closure. These locations are found on limb extremities, tail and some regions of the trunk (PAVLETIC, 2018).

Closure by second intention allows for optimal drainage of the wound, whether of inflammatory or purulent content. However, it has the disadvantage of taking a longer time for total tissue repair of the injured bed to occur (WALDRON; ZIMMERMAN-POPE, 2003). In addition, they may still have

some failures to produce complete healing. The new epithelium being formed is fragile, wound contraction may occur excessively, epithelialization may not be complete in certain cases, leaving granulation tissue exposed in the wound bed that can grow excessively). The preparation of the wound for the treatment by second intention is the same as already described, an adequate shaving, antiseptic and debridement must be performed. After bed treatment, the wound must be closed with dressings or bandages and have an adequate control to avoid the occurrence of possible infections and traumas (WALDRON; ZIMMERMAN-POPE, 2003).

In most cases, treatment by second intention is a practical and cost-effective method of wound closure, provided that proper care is taken in wound management. However, in cases where this healing can be prolonged due to systemic or local changes, the cost can increase considerably, due to the constant requirement of materials for the dressing and medicines (PAVLETIC, 2018).

TREATMENT BY THIRD INTENTION OR TERTIARY CLOSURE

Treatment by third intention is indicated for contaminated and very extensive wounds, which cannot be closed by first intention, precisely because they are contaminated, and which would take a long time to close by second intention. This treatment consists of leaving the wound open in cases of infection of the bed with the presence of non-viable tissues. After treatment, when there is no more evidence of infection and the wound is healthy, surgical occlusion is performed using sutures or tissue reconstruction techniques (BELDON, 2010). This procedure is also indicated in cases where wound epithelialization and contraction were not successful in healing by second intention,

or when it was not possible to perform closure by first intention immediately (MACPHAIL, 2015). It is also used in cases of persistence of devitalized and necrotic tissues, requiring additional care with the wound and performing debridement for a few days; and when the presence of a moderate to severe persistent inflammatory response occurs (PAVLETIC, 2018). By treating the wound openly for a few days, it is possible to reduce bacterial contamination of the bed to improve its appearance before closure. During this time, granulation tissue will develop, providing a vascular substrate, which helps to control contamination and facilitate healing (HOSGOOD, 2018). For wound occlusion, resection or debridement of excess granulation tissue must be performed. Next, the skin margins must be resected, washed and the edges approached so that a good suture occurs, without the occurrence of large areas of tension (MACPHAIL, 2015). Very extensive wounds may require the use of reconstruction techniques, such as muscle, skin and myocutaneous flaps, or even the use of free skin grafts.

The use of drains must be considered when there are doubts about the degree of tissue contamination or the effectiveness of dead space reduction. Drains allow the removal of exudates and daily cleaning of the bed, improving the quality of the wound and increasing the speed of healing (WALDRON; ZIMMERMAN-POPE, 2003, MACPHAIL, 2015).

FINAL CONSIDERATIONS

The high incidence of wounds, both in veterinary medicine and in human medicine, shows us the relevance of this subject and the importance of study and deepening for the best approach to each patient.

Therefore, knowledge of the physiological events involved in each phase of the healing

process, as well as the factors that can influence this process, either negatively or positively, are of great importance for understanding the injury, the repair phase in which it takes place, finds, and with that, the best therapy indicated for each patient and wound in question.

REFERENCES

- ALVES, D. G. L.; LIMA, D. F.; ROCHA, S. G.; KASHIWABARA, T. G. B. Estrutura e função da pele. In: KASHIWABARA, T. G. B.; KASHIWABARA, Y. M. B.; ROCHA, L. L. V.; BACELAR, L. L. F.; FRANÇA, P. L. V. L. *Medicina Ambulatorial IV: com ênfase em dermatologia*. 4 ed. Dejan Gráfica e Editora, 2016, p.13-24.
- AMORIM, E.; MATIAS, J. E. F.; COELHO, J. C. U.; CAMPOS, A. C. L.; STAHLKE JUNIOR, H. J.; TIMI, I. R. R.; ROCHA, L. C. A.; MOREIRA, A. T. R.; JUSPOLI, D. Z.; FERREIRA, L. M. Efeito do uso tópico do extrato aquoso de *Orbignya phalerata* (Babaçu) na cicatrização de feridas cutâneas - estudo controlado em ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v.21, supl. 2, p.67-76, 2006.
- ASHCROFT, G. S.; MILLS, S. J.; ASHWORTH, I. J. Ageing and wound healing. *Biogerontology*, v.3, n.6, p.337-345, 2002.
- AYELLO, E. A.; CUDDIGAN, J. E. Debridement: controlling the necrotic/cellular burden. *Advances in Skin and Wound Care*, v.17, n.2, p.66-75, 2004.
- BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.41, n.1, p.27-51, 2005.
- BANKS, W. J. Integumentary system. In: BANKS, W. J. *Applied Veterinary Histology*. 3 ed. Mosby, 1993, p.325-353.
- BELDON, P. Basic science of wound healing. *Surgery*, v.28, n.9, p.409-412, 2010.
- BROUGHTON, G.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. The Basic Science of Wound Healing. *Plastic and Reconstructive Surgery*, v.117, n.75, p.12-34, 2006.
- BUCKNALL, T. E. The effect of local infection upon wound healing: An experimental study. *British Journal of Surgery*, v.67, n.12, p.851-855, 1980.
- CAMPOS, A. C. L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A. K. Cicatrização de feridas. *Arquivos Brasileiros de Cirurgias Digestivas*, v.20, n.1, p.51-58, 2007.
- EDWARDS, R.; HARDING, K. G. Bacteria and wound healing. *Current Opinion in Infectious Diseases*, v.17, n.2, p.91-96, 2004.
- FAHIE, M. A. Primary wound closure. In: JOHNSTON, S. A.; TOBIAS, K. M. *Veterinary Surgery Small Animal*. 2 ed. Elsevier, 2018, p.3780-3809.
- GOTTRUP, F. Wound closure techniques. *Journal of Wound Care*, v.8, n.8, p.397-400, 1999.
- GUO, S.; DIPIETRO, L. A. Factors Affecting Wound Healing. *Journal of Dental Research*, v.89, n.3, p.219-229, 2010.
- HATANAKA, E.; CURI, R. Ácidos graxos e cicatrização: uma revisão. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.88, n.2, p.53-58, 2007.
- HEAL, C. F.; BANKS, J. L.; LEPPER, P. D.; KONTOPANTELS, T.; VAN DRIEL, M. L. Topical antibiotics for preventing surgical site infection in wounds healing by primary intention. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, n.11, p.1-73, 2016.
- HOSGOOD, G. Open wounds. In: JOHNSTON, S. A.; TOBIAS, K. M. *Veterinary Surgery Small Animal*. 2 ed. Elsevier, 2018, p.3810-3839.
- HOSGOOD, G. Wound repair and specific tissue response to injury. In: SLATTER, D. *Textbook of Small Animal Surgery*. 3 ed. v. 1. Saunders, 2003, p.91-111.

- ISAAC, C.; DE LADEIRA, P. R. S.; DO RÊGO, E. M. P.; ALDUNATE, I. C. B.; FERREIRA, M. C. Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. *Revista de Medicina*, v.89, n.3/4, p.125-131, 2010.
- JONES, S. G.; EDWARDS, R.; THOMAS, D. W. Inflammation and Wound Healing: The Role of Bacteria in the Immuno-Regulation of Wound Healing. *The International Journal of Lower Extremity Wounds*, v.3, n.4, p.201-208, 2004.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, I. Pele e anexos. In: JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, I. *Histologia Básica: texto e atlas*. 12 ed. Guanabara Koogan Ltda, 2013, p. 353-366.
- KIRSHEH, C.; WOO, K.; AYELLO, E. A.; SHIBBALD, R. G. Debridement: a vital component of wound bed preparation. *Advances in Skin and Wound Care*, v.19, n.9, p.506-517, 2006.
- KONDO, T.; ISHIDA, Y. Molecular pathology of wound healing. *Forensic Science International*, v.203, p.93-98, 2010.
- LAUREANO, A.; RODRIGUES, A. M. Cicatrização de feridas. *Revista da Sociedade Portuguesa de Dermatologia e Venereologia*, v.69, n.3, p.355-367, 2011.
- LAWRENCE, W. T.; DIEGELMANN, R. E. Growth factors in wound healing. *Clinics in Dermatology*, v.12, n.1, p.157-169, 1994.
- LEITE, A. P.; OLIVEIRA, B. G. R. B.; SOARES, M. F.; BARROCAS, D. L. R. Uso e Eficácia da Ipatina no Processo de Cicatrização de Feridas: uma revisão sistemática. *Revista Gaúcha de Enfermagem*, v.33, n.3, p.198-207, 2012.
- LI, J.; CHEN, J.; KIRSNER, R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clinics in Dermatology*, v.25, n.1, p.9-18, 2007.
- LLCAS, R. Semiologia da pele. In: FEITOSA, F. L. F. *Semiologia veterinária: a arte do diagnóstico*. 2 ed. Roca, 2004, p.641-676.
- MACPHAIL, C. M. Cirurgia do Sistema Tegumentar. In: FOSSUM, T. W. *Cirurgia de Pequenos Animais*. 4 ed. Elsevier Editora Ltda, 2015, p.546-596.
- MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v.78, n.4, p.393-410, 2003.
- MURTHA, A. P.; KAPLAN, A. L.; PAGLIA, M. I.; MILLS, B. B.; FELDSTEIN, M. L.; RUFF, G. L. Evaluation of a Novel Technique for Wound Closure Using a Barbed Suture. *Plastic and Reconstructive Surgery*, v.117, n.6, p.1769-1780, 2006.
- NUUTINEN, P.; RIEKKI, R.; PARIKKA, M.; SALO, T.; AUTIO, P.; RISTELL, J.; OIKARINEN, A. Modulation of collagen synthesis and mRNA by continuous and intermittent use of topical hydrocortisone in human skin. *British Journal of Dermatology*, v.148, n.1, p.39-45, 2003.
- PACANELA, I. C.; RIBAS, L. M.; SANTOS, C. A.; FEIJÓ, L. S.; NOGUEIRA, C. E. W.; FERNANDES, C. G. Abordagem clínica de feridas cutâneas em equinos. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, v.104, n.569-572, p.13-18, 2009.
- PAVLETIC, M. M. Basic Principles of Wound Healing. In: PAVLETIC, M. M. *Atlas of Small Animal Wound Management and Reconstructive Surgery*. 4 ed. Wiley-Blackwell, 2018, p.17-32.
- PAVLETIC, M. M. Basic Principles of Wound Management. In: PAVLETIC, M. M. *Atlas of Small Animal Wound Management and Reconstructive Surgery*. 4 ed. Wiley-Blackwell, 2018, p.33-52.
- PAVLETIC, M. M. Common Complications in Wound Healing. In: PAVLETIC, M. M. *Atlas of Small Animal Wound Management and Reconstructive Surgery*. 4 ed. Wiley-Blackwell, 2018, p.143-172.
- POWER, C.; WANG, J. H.; SOOKHAI, S.; STREET, J. T.; REDMOND, H. P. Bacterial Wall Products Induce Downregulation of Vascular Endothelial Growth Factor Receptors on Endothelial Cells via a CD14-Dependent Mechanism: Implications for Surgical Wound Healing. *Journal of Surgical Research*, v.101, n.2, p.138-145, 2001.
- REITER, D. Methods and Materials for Wound Closure. *Otolaryngologic Clinics of North America*, v.28, n.5, p.1069-1080, 1995.
- ROBSON, M. C.; STENBERG, B. D.; HEGGERS, J. P. Wound Healing Alterations Caused by Infection. *Clinics in Plastic Surgery*, v.17, n.3, p.485-492, 1990.
- SINGER, A. J.; CLARK, R. A. F. Cutaneous Wound Healing. *New England Journal of Medicine*, v.341, n.10, p.738-746, 1999.
- SMANIOTTO, P. H. D. S.; DALLI, R.; CARVALHO, V. F.; FERREIRA, M. C. Tratamento clínico das feridas - curativos. *Revista de Medicina*, v.89, n.3/4, p.137-141, 2010.

- STANLEY, B. J.; CORNELL, K. Wound Healing. In: JOHNSTON, S. A.; TOBIAS, K. M. *Veterinary Surgery Small Animal*. 2 ed. Elsevier, 2018, p.487-529.
- TAZIMA, M. F. G. S.; VICENTE, Y. A. M. V. A.; MORIYA, T. Biologia da Ferida e Cicatrização. *Medicina*, v.41, n.3, p.259-264, 2008.
- TOBIAS, K. M. Primary wound closure. In: TOBIAS, K. M. *Manual of Small Animal Soft Tissue Surgery*. Wiley-Blackwell, 2010, p.5-16.
- TOTTOLI, E. M.; DORATI, B.; GENTA, I.; CHIESA, E.; PISANI, S.; CONTI, B. Skin Wound Healing Process and New Emerging Technologies for Skin Wound Care and Regeneration. *Pharmaceutics*, v.12, n.(8), p.1-30, 2020.
- VALKO M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v.39, p.44-84, 2007.
- VAN HENGEL, T.; TER HAAR, G.; KIRPENSTEIJN, J. Wound management: a new protocol for dogs and cats. In: KIRPENSTEIJN, G.; TER HAAR, G. *Reconstructive Surgery and Wound Management of the Dog and Cat*. Manson Publishing Ltd, 2013, p.21-48.
- VERMEULEN, H.; UBBINK, D. T.; GOOSSENS, A.; DE VOS, R.; LEGEMATIEL, D. A.; WESTERBOS S. I. Dressings and topical agents for surgical wounds healing by secondary intention. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, n. 1, p. 1-36, 2004.
- WALDRON, D. R.; ZIMMERMAN-POPE, N. Superficial skin wounds. In: SLATTER, D. *Textbook of Small Animal Surgery*. 3 ed. v. 1. Saunders, 2003, p.284-298.
- WILMINK, J. M.; VAN WEEREN, P. R. Treatment of exuberant granulation tissue. *Clinical Techniques in Equine Practice*. v.3, p.141-147, 2004.
- WORTHLEY, L. I. Shock: a review of pathophysiology and management: part I. *Critical Care and Resuscitation*, v.2, p.55-65, 2000.

CAPÍTULO 2: Princípios no tratamento de feridas – parte dois

v. 2, n. 18, 2022

International
Journal of
**Health
Science**

WOUND TREATMENT PRINCIPLES - PART TWO

Lara Bernardes Bizinoto

Postgraduate Program in Animal Health and
Production in the Tropics
<http://lattes.cnpq.br/9796764351091102>
<https://orcid.org/0000-0003-2409-629X>

Fernanda de Oliveira Soares

Postgraduate Program in Animal Health and
Production in the Tropics
<http://lattes.cnpq.br/6136278496987143>
<https://orcid.org/0000-0001-7906-7897>

Isabel Rodrigues Rosado

Postgraduate Program in Animal Health and
Production in the Tropics; clinic: Pulo do
Gato; Universidade de Uberaba
<http://lattes.cnpq.br/5855259434191533>
<https://orcid.org/0000-0001-7819-4253>

Ian Martin

Postgraduate Program in Animal Health and
Production in the Tropics; Universidade de
Uberaba
<http://lattes.cnpq.br/4730020772591126>
<https://orcid.org/0000-0001-6934-8257>

Endrigo Gabellini Leonel Alves

Postgraduate Program in Animal Health and
Production in the Tropics; clinic: Pulo do
Gato; Universidade de Uberaba
<http://lattes.cnpq.br/4550784508252779>
<https://orcid.org/0000-0001-8524-3949>

All content in this magazine is
licensed under a Creative Com-
mons Attribution License. Attri-
bution-Non-Commercial-Non-
Derivatives 4.0 International (CC
BY-NC-ND 4.0).



Abstract: Wounds are defined as any interruption of the skin continuity solution, which may be to a greater or lesser extent and generate great damage to the patient if not treated correctly. Firstly, the patient must be stabilized, if necessary, and then a plan is drawn up for the adequate treatment of the lesion. After that, several procedures can and must be done to assist in the healing process, preventing the injury from worsening and minimizing healing time. The purpose of this chapter is to discuss washing techniques and decontamination solutions, debridement, culture and antimicrobial susceptibility tests, dressings, bandages and wound drainage techniques.

Keywords: Antimicrobials, dressings, debridement, drainage, wounds.

INTRODUCTION

After a tissue injury, immediate wound management is indicated, temporarily covering the affected site to avoid trauma, reduce the microbial load and avoid further contamination. Then, the general condition of the patient must be evaluated and stabilized, if necessary. (MACPHAIL, 2015).

In unstable animals, washing the wound with sterile solution or running water is recommended, followed by the application of some topical antimicrobial agent and covering with a bandage. This bandage can be left in place until the animal is more stable and it is possible for a better assessment of the wound to occur for planning a definitive treatment (HOSGOOD, 2018).

If there is no need to stabilize the patient, it is indicated to perform a wide shaving around the wound and wash it with sterile solution or running water. Then, it is suggested to collect a sample for bacterial and fungal culture, in order to obtain a more efficient therapeutic protocol. After that, antiseptics must be performed, followed by debridement to

remove non-viable tissues and cellular debris, and finally, determine the best treatment plan (MACPHAIL, 2015).

Regardless of the choice of type of wound treatment, it is essential that all the steps above are followed, so that there is a better prognosis and result, and faster healing time.

WASHING TECHNIQUES AND WOUND DECONTAMINATION SOLUTIONS

One of the most important care in wound care is the removal of contaminants and the reduction of the existing microbial load in the wound bed, which negatively affects healing. This removal takes place through washing, cleaning and subsequent debridement of the wound, removing exudates, necrotic and devitalized tissues, and consequently, removing microorganisms present in these substrates (RODEHEAVER; RATLIFF, 2018).

WASHING TECHNIQUES

In contaminated and infected wounds, the bed must be washed, eliminating cellular debris, microorganisms, necrotic tissues and dirt, so that the healing process occurs efficiently. This procedure can be performed through the pressure exerted by a fluid on the wound. Among the solution options for washing, isotonic crystalloid fluids stand out, which are sterile and allow the removal of contaminants without additional injury to the wound bed and without interfering with the collection of samples for the culture and isolation of microorganisms. As alternative fluids, running water and antiseptic solutions can be mentioned (VAN HENGEL et al., 2013). The main purpose of washing is the mechanical removal of contaminants by the physical pressure exerted by the fluid on the wound bed, therefore the addition of antiseptic solutions is not recommended until samples

are collected for culture and antimicrobial susceptibility testing (WILLIAMS, 1999). Although antiseptics reduce the number of bacteria in the wound bed, they hinder the isolation of contaminating microorganisms. In addition, they can damage viable tissues, as some concentrations can be cytotoxic, and have a reduced effect on already established infections (MACPHAIL, 2015).

Running water is not ideal for this procedure, since it is cytotoxic to fibroblasts due to its alkaline pH, because it is hypotonic in relation to the wound bed and because it carries the presence of some microelements in its composition that can affect the wound (WILLIAMS, 1999). However, there is no evidence that its use increases the risk of infection in the wound bed (RESENDE et al., 2015). Running water is a good alternative for non-hospital conditions where more appropriate solutions are not available.

Among the ideal solutions (isotonic crystalloids), the saline solution is the most used because it is easily found in pharmacies, offices, clinics and hospitals. It presents an osmotic pressure similar to that in body fluids, does not interfere with the wound healing process and does not cause greater tissue damage or irritation to the intact tissue (LAWRENCE, 1997).

The pressure indicated for adequate bed washing is between 4 to 15 psi (pounds per square inch). One of the methods used for washing is through the use of a 20 to 30 ml syringe attached to a fluid bag and equipment by a 3-way stopcock. This method entails a pressure of about 8 psi to the wound bed (WILLIAMS, 1999). Another washing method where the pressure is around 7 to 8 psi is the use of a pressure cuff at 300 mmHg over a 1 liter fluid bag (MACPHAIL, 2015). A pressure higher than 15 psi is not indicated by the possibility of causing greater injury to the wound bed, and pushing dirt and

bacteria to the deeper layers of the tissues (VAN HENGEL et al., 2013).

The wound must not be rubbed during washing, either with a sponge or other material, as this action generates greater tissue damage, compromising the wound's ability to resist infections and generating a greater inflammatory response in the injured bed (MACPHAIL, 2015).

WOUND DECONTAMINATION SOLUTIONS

Decontamination solutions for wounds include topical antiseptics, which are used after washing with the main purpose of killing or inhibiting the growth of microorganisms present on the surface of the wound bed, as they are unable to penetrate deeper layers of the tissue. For a washing solution to reach deeper layers of the fabric, and act more efficiently, its concentration must be higher, which can end up causing greater damage to the fabrics (RODEHEAVER; RATLIFE, 2018). High concentrations of antiseptics have greater cytotoxic action and harm cells important for healing. They are lethal to some polymorphonuclear cells, such as neutrophils, alter blood capillaries, impairing neovascularization and decrease collagen synthesis by toxic action against fibroblasts (HOSGOOD, 2003).

Keratinocytes are also affected by the toxicity of antiseptics at high concentrations. These cells proliferate and form a protective first layer for the wound during the proliferation and epithelialization phase, and are more sensitive to topical products than the already fully stratified and keratinized epidermal layers (WILSON et al., 2005). Therefore, the indication of the use of antiseptics occurs mainly in the initial phases of the wound, to reduce the bacterial load and the chances of infection, and also helping in the removal of necrotic tissues and

cellular debris. When the wound is already clean, without the presence of exudates and non-viable tissues, the use of antiseptics is contraindicated due to the direct negative effects on healthy tissues and healing (MACPHAIL, 2015). In cases where the wound does not yet present purulent exudate or devitalized tissues, the professional must evaluate the wound bed and try to determine the degree of contamination and the risk factors present. If there is a high possibility of the occurrence of bed infection, antiseptics must be used (BIANCHI, 2000).

Among the most commonly used antiseptics for cleaning and decontaminating wounds, we can mention compounds based on chlorhexidine, iodine, Dakin's liquid (0.5% sodium hypochlorite) and Tris-EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid) (VAN HENGEL et al., 2013).

DEBRIDEMENT

Another very important factor in the management and treatment of wounds, especially those classified as contaminated and infected, is debridement. This procedure encompasses several methods and techniques with the aim of removing exudate, devitalized and necrotic tissue, cellular debris, foreign bodies and decreasing the bacterial load from the wound bed, which were not completely removed with pressure washing and wound cleaning (O'BRIEN, 2002; AYELLO; CUDDIGAN, 2004).

The wound must be explored in its entirety, covering all the layers affected for debridement to be successful. The procedure must be performed aseptically, thus preventing any type of iatrogenic contamination (HOSGOOD, 2018). The way it will be performed is influenced by the appearance of the wound, its extent and tissue damage, amount of necrotic tissue, presence or absence of bed infection, the

occurrence of sepsis, vascularization of the bed, adjacent tissues and its anatomical location (RAMUNDO; GRAY, 2008). There are six main methods of debridement: surgical, mechanical, autolytic, enzymatic, chemical and biosurgical (VAN HENGEL et al., 2013), which will be detailed below.

SURGICAL OR SHARP DEBRIDEMENT

This technique is performed with the aid of instruments such as scalpels, scissors and curettes for the removal of non-viable, devitalized and necrotic tissue that have a thicker and adherent aspect (FALABELLA, 2006). It is a procedure that requires functional anatomical knowledge of the site to be debrided and the recognition of intact tendons, nerves and blood vessels, avoiding any type of injury to these structures. But the main point that must be taken into consideration is the extent of debridement, taking care not to reach or remove large areas of viable tissue (VOWDEN; VOWDEN, 1999). This method is also indicated when large amounts of devitalized tissue need to be removed quickly, especially in cases of infected wounds or the presence of sepsis. When debridement approaches viable tissues, it can be a procedure that causes discomfort, so care with analgesia during and after the procedure must be taken into account, and depending on the severity of the injury and its extension, it must be performed within the block surgery under general anesthesia (AYELLO; CUDDIGAN, 2004).

After surgical debridement, the wound is usually treated openly, with dressings and bandages. Third-intention treatment can be performed when the tissue appears healthy and granulation tissue grows; or it can be left to heal by second intention, with the process of epithelialization and wound contraction taking place (MACPHAIL, 2015).

MECHANICAL DEBRIDEMENT

This procedure consists of the physical removal of non-viable and necrotic tissue from the wound bed quickly (ATKIN, 2014). It is more used in extensive wounds, with a large presence of exudate, but it can also be used in smaller wounds, helping to remove cellular debris (FALABELLA, 2006).

There are some methods that can be used for this procedure, such as the application of abrasive forces through a gauze on the wound bed, or the use of irrigation under pressure to the extent of the wound (O'BRIEN, 2002; HOSGOOD, 2018).

The use of abrasive methods has disadvantages as it is a non-selective process, removing healthy granulation tissue, epithelial cells and fluids containing growth factors and cytokines, causing damage to viable tissues, delaying the healing process and generating pain to the patient (VAN HENGEL et al., 2013).

The use of irrigation is a preferable method to abrasion, being quite effective and not causing much pain. This procedure directly follows the guidelines of the wound washing process, in order to apply a certain pressure to the wound bed, through saline solutions, in order to remove cellular debris and non-viable tissues (STEED, 2004). It also helps to remove adhered necrotic tissues, as it moistens their structures, facilitating removal (FALABELLA, 2006).

AUTOLYTIC DEBRIDEMENT

This procedure is performed using an occlusive dressing covering the entire wound, allowing the release of proteases by the organism itself in the injured bed with the function of liquefying non-viable and necrotic tissues (STEED, 2004). It is a natural method of debridement and the most used for the treatment of wounds, as any dressing that allows a moist environment in the bed

assists in the autolytic process, allowing these enzymes to break down non-viable tissues (ATKIN, 2014).

The dressing must remain in place for about 2 to 3 days, and when removed, the wound must be washed with saline to remove all cellular debris. It is a method that must not be performed on infected wounds, and if signs of infection appear, such as the presence of purulent exudate, this method must be discontinued and preference given to faster procedures, such as surgical debridement (AYELLO; CUDDIGAN, 2004). Autolytic debridement has advantages because it is painless for the patient, is quite safe and easy to perform, with excellent results. However, as it is a slow process, it can take considerable time to obtain the desired result, and thus, end up increasing the risk of infection. It is a procedure that can be performed in order to hydrate the wound for a while, and then perform another type of debridement (VOWDEN; VOWDEN, 1999).

ENZYMATIC DEBRIDEMENT

Unlike autolytic debridement, this method is performed by the deposition of exogenous enzymes in the wound bed so that the degradation of cellular debris, non-viable tissues and removal of necrotic tissue occurs (KIRSHEN et al., 2006).

This debridement can be done on contaminated and infected wounds, and enzyme agents can be applied 1 to 2 times daily directly to non-viable tissues within the wound bed, avoiding surrounding healthy areas of skin. It is important to emphasize that large extensions of necrotic tissue must be removed prior to the start of the enzymatic treatment to facilitate the procedure (STEED, 2004; RAMUNDO; GRAY, 2008).

The most commonly used exogenous enzymes for this purpose are collagenase, papain, trypsin, fibrinolysin, chymotrypsin

and deoxyribonuclease, which are usually found in ointments and creams (JOHNSTON, 1990, VAN HENGEL et al., 2013).

CHEMICAL DEBRIDEMENT

Uses the application of chemical substances to perform debridement in the wound bed. The most used substances are chlorhexidine, povidone-iodine, hydrogen peroxide and sodium hypochlorite (KRAHWINKEL; BOOTHE, 2006). In addition to the debridement function, they are used to prevent and contain wound infection (AYELLO; CUDDIGAN, 2004). Chemical debridement has the same disadvantage as the mechanical procedure, that is, it is not selective, damaging viable tissues and cells important for healing, and may irritate tissues adjacent to the wound bed. For these reasons, it is not a suitable procedure for clean wounds, but it is quite useful in contaminated and infected wounds (O'BRIEN, 2002, VAN HENGEL et al., 2013).

BIOSURGICAL OR BIOLOGICAL DEBRIDEMENT

This method consists of deposition of larvae directly on the wound bed to perform biological debridement (ATKIN, 2014). This procedure uses sterile larvae of the *Lucilia sericata* species, created specifically for biosurgery, which debride the wound by excreting proteolytic enzymes (O'BRIEN, 2002).

Through these enzymes, they remove up to 75 mg of necrotic tissue per day, clean the wound by consuming non-viable/dead tissue and bacteria present in the bed and promote the formation of granulation tissue. Therefore, they are recommended in wounds with a large amount of necrotic tissue, with the presence of infection and in cases of chronic wounds (MACPHAIL, 2015).

For the success of the technique, it is necessary to use a self-adhesive hydrocolloid

dressing with an orifice in the shape and size of the wound bed, where the larvae are deposited at a density of 5-10 per cm² of tissue. This dressing serves to prevent the action of proteolytic enzymes on the intact tissue, the migration of larvae out of the wound bed and dehydration of the larvae. The dressing is closed and kept for 48-72 hours, and can be performed twice a week (WILLIAMS, 1999, MACPHAIL, 2015).

This therapy has the advantage of providing an accelerated debridement, however, it has a higher cost compared to other debridement alternatives, due to the sterile culture of larvae, and may not be accepted by all patients (ATKIN, 2014).

CULTURE AND ANTIMICROBIAL SENSITIVITY TESTS

All wounds have the risk of presenting some degree of contamination or of being already infected (KRAHWINKEL; BOOTHE, 2006), which can make it difficult and even prevent the tissue to heal successfully. The development of the infection depends on the virulence and amount of microorganisms deposited in the wound, the severity of tissue trauma, the presence of dirt and foreign bodies in the wound bed, the time elapsed between the injury and its treatment, and the immunocompetence of the affected patient. (MACPHAIL, 2015). There is a correlation between the initial classification of a wound for contamination and its progression to infection. The literature describes that 0 to 6% of clean wounds, 4.5 to 9.3% of clean-contaminated wounds and 5.8 to 28.6% of contaminated wounds will become an infected wound (WILLARD; SCHULZ, 2015).

Culture and antimicrobial susceptibility testing (AST) are recommended in cases of contaminated and infected wounds, but because accurate classification of wounds is very difficult, the authors of this chapter

recommend collecting specimens for culture in all cases. The results of the culture and TSA are very important for the correct choice of treatment, avoiding the occurrence of resistance and delay in healing. It is worth noting that empirical treatment with broad-spectrum antibiotics must be started until the results of culture and TSA exams are obtained (MACPHAIL, 2015).

Sample collection for culture must be performed after cleaning the wound and before decontaminating it. To be successful, the material collected must be from viable tissue, not purulent exudate or necrotic tissue. It is worth remembering that the collection procedure must be performed using aseptic techniques (BONHAM, 2009). The collection can be performed by removing a fragment (biopsy) from the wound bed or using sterile swabs, the most suitable being those that already have a culture medium for transport where the collection is inserted (BECO et al, 2013).

Biopsy is a more invasive procedure and is generally used in deeper wounds, avoiding the collection of superficial material that does not represent the focus of infection. The collection can be done with the aid of punches or other sterile surgical instruments, depending on the depth of the lesion (BECO et al, 2013).

Another way of collecting the culture is through aspiration of exudates that are below the superficial layers of the wound with a needle. This procedure must be performed within the aseptic techniques to avoid exogenous contamination (BOWLER et al., 2001).

It is important to emphasize that the examination of microbial culture and isolation (bacterial and fungal) does not present high sensitivity, that is, a negative result in the culture does not guarantee that the wound is not contaminated. For its classification, the clinical aspects of the wound, such as

color, time of occurrence, presence of dirt, foreign bodies and/or exudate, must also be taken into account. The positive result in the culture also does not guarantee that it is an infected wound, it may just be a contaminated wound and not evolve to infected, depending on the quantity and virulence of the isolated microorganism and the patient's immunity (SINGH; WEESE, 2018).

ANTIMICROBIALS MOST USED IN WOUND TREATMENT

Antimicrobials can be used through systemic or topical therapy on the wound. The association of the two treatment methods can be performed in cases of contaminated wounds, in order to prevent the installation of an infection in the bed or to treat a wound with an infection already installed where only topical treatment may be ineffective (SCHULTZ et al, 2003, LIPSKY; HOEY, 2009, MACPHAIL, 2015).

The antimicrobial effect on bacteria can be variable, as it is influenced by the number of microorganisms, the patient's general condition and growth stage (age), intrinsic and extrinsic mechanisms of resistance, environmental factors and the host's immune system (DIPIRO et al, 1996). To increase the chance of successful treatment, the selection of antimicrobials for use in wounds must preferably be based on culture and sensitivity tests, avoiding the possible occurrence of bacterial resistance in the wound bed (KRAHWINKEL; BOOTHE, 2006).

Even if the right antibiotic is chosen, it must never replace any of the essential phases of wound management, particularly in relation to debridement, whether surgical, mechanical or enzymatic. That is, the use of antimicrobials must be used in conjunction with all other procedures necessary for good bed preparation and consequent healing (VAN HENGEL et al., 2013).

The most commonly used systemic antibiotics for the prevention of wound bed infection include cephalosporins, sulfamethoxazole+trimethoprim, gentamicin, ampicillin, quinolones and amoxicillin + clavulanate, always taking into account the result of culture and sensitivity tests when possible (WALDRON; ZIMMERMAN-POPE, 2003).

Ampicillin and amoxicillin are effective against a variety of gram-positive aerobic bacteria and some gram-negative and positive anaerobic bacteria. First-generation cephalosporins are effective for most gram-positive and some negative microorganisms; second-generation ones have greater action against gram-negative and anaerobic bacteria; and the third generation are effective against 90% of gram-positive bacteria. Gentamicin is effective against gram-positive and negative bacteria; quinolones and sulfa drugs also act against these organisms, but the effectiveness may vary depending on the factors already mentioned (WILLARD; SCHULZ, 2015).

Systemic antibiotic therapy is an extremely important part of the treatment of wounds, because in addition to treating it, it prevents microorganisms from spreading, infecting other distant tissues and can even cause serious systemic changes, such as the Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS). However, local therapy with topical antimicrobials can be used alone in superficial and poorly contaminated wounds (SINGH; WEESE, 2018).

Topical therapy must assist in the healing process by protecting the wound from the occurrence of infections, mechanical injuries and providing a microenvironment favorable to the natural processes of tissue repair. It is noteworthy that most drugs have no effect on devitalized tissue or in the presence of hematomas and clots, and therefore, the wound must be cleaned and debrided for

topical therapy to be effective. It is also worth remembering that if the lesion is already infected and with suppuration, the benefits of the topical antimicrobial are small (VAN HENGEL et al., 2013, MACPHAIL, 2015).

The most commonly used topical antibiotics are triple antibiotic ointment (bacitracin, neomycin, polymyxin), silver sulfadiazine, nitrofurazone, gentamicin, cefazolin, and mafenide. Triple ointment is broad spectrum, being efficient in combating several bacteria that commonly colonize superficial wounds, however, it is more competent in preventing infections than treating them (MACPHAIL, 2015).

Silver sulfadiazine is efficient against most gram-negative and gram-positive bacteria and fungi, commonly used for burns, in addition to acting as an antimicrobial barrier, penetrating necrotic tissue and improving epithelialization. Nitrofurazone has broad-spectrum antibacterial activity and hydrophilic action, helping to drain exudates, but has the disadvantage of delaying wound epithelialization (KRAHWINKEL; BOOTHE, 2006, MACPHAIL, 2015).

Gentamicin is effective against gram-negative bacteria and *Staphylococcus* spp., and its use in solutions is preferable to ointment or creams. The isotonic solution helps in the speed of epithelialization and contraction of the wound, when compared to the use of creams and ointments. Unlike gentamicin, cefazolin is effective against gram-positive and some gram-negative bacteria (SWAIM, 1990, VAN HENGEL et al., 2013).

Mafenide is an antimicrobial compound available in the form of a spray, having a broad spectrum against several gram-negative and gram-positive bacteria, including some anaerobic species, and therefore, it is used mainly in extremely contaminated wounds (MACPHAIL, 2015).

Once the wound has healthy granulation tissue, antibiotic therapy can be stopped, whether topical or systemic, as the mechanical barrier provided by the granulation tissue, together with the blood supply of new vessels, allows the wound to be resistant to damage. infections (WALDRON; ZIMMERMAN-POPE, 2003).

BANDAGES, DRESSINGS AND WOUND PROTECTION TECHNIQUES

Dressings are materials applied directly in contact with the wound, in order to aid healing, and bandages are used externally to the dressings, in order to secure them around the wound and provide additional mechanical protection. al., 2013). Bandages help wound healing by protecting it from the external environment, absorbing exudates, eliminating dead space, and applying or relieving the pressure exerted on the wound. In addition, it retains topical medications, helps control pain, restricts or allows safe movement, and ultimately immobilizes, stabilizes, and supports structures adjacent to the wound.

The bandages are divided into three well-defined layers: the first layer, usually composed of a dressing that has been in direct contact with the lesion; the second layer is padded, with the function of exerting pressure and/or absorbing liquids from the wound; and the third layer, with a protection function (WILLIAMS, 1999).

The first layer composed of the dressing can be adherent or non-adherent. The adherent dressing is usually made with gauze in direct contact with the wound, with the aim of generating a mechanical debridement of the bed. Exudates, necrotic tissue, and cellular debris will settle on the gauze, and when the dressing is changed, all of this material is removed along with it. It is a procedure that can be painful, removing not

only the dead tissue, but also causing damage to viable tissues and various cells responsible for healing (MILLER, 2003).

Non-adherents are used when there is already healthy granulation tissue in the bed, not harming healing. Dressings can still be classified as occlusive, semi-occlusive and non-occlusive: the first is waterproof, used for wounds with little exudate; the second allows a certain amount of the fluid to escape to the absorption layer; and the third allows all the fluid to reach the absorptive layer, with gauze as an example (VAN HENGEL et al., 2013).

Occlusive and semi-occlusive dressings are preferable in decontaminated wounds, as both are able to keep the wound environment moist, bringing benefits to healing and not causing pain with their removal. Among them we can mention foams, hydrogels, hydrocolloids and alginates (DHIVYA et al., 2015). The dressing is chosen based on the type of wound, its depth, location and extent, the degree of infection and the amount of exudate produced (GHOMI et al., 2019). The first layer of the bandage consists of serving as a last barrier between the wound and external contaminants, absorbing exudates or transferring them to the second layer and keeping the environment moist, assisting in autolytic debridement, granulation tissue formation, epithelialization and wound contraction (CAMPBELL, 2018).

The second or intermediate layer is absorptive and its function is to remove liquids expelled by the wound, whether blood or exudates, as well as cellular debris and bacteria, from the dressing and the wound. In addition to the absorption function, it also protects and fixes the first layer that is in contact with the wound, protects from seroma formation by promoting a medium compression around the wound and still provides greater comfort to the patient (DEVEY et al., 2017).). It is important that

this second layer has good capillarity and is thick enough, being able to use more than one layer to collect all the fluid and keep it away from the dressing and the wound (WILLIAMS, 1999). One of the most used materials for this second level is cotton, but it is important that it does not come into contact with the wound surface, and it may be difficult to remove it later (MILLER, 2003).

The third layer has the function of fixing and keeping the other two layers in place, in addition to protecting against contamination from the external environment and physical abrasions. It is important to be careful to assess whether the second layer is not saturated with exudate, which can end up affecting the third layer, causing it to lose its protective function as it allows the access of bacteria from the external environment through regions contaminated by the fluid. The materials used in this layer can be elastic or inelastic, adherent or adhesive, porous or waterproof (MILLER, 2003, DEVEY et al., 2017, CAMPBELL, 2018).

DRAINAGE TECHNIQUES

In the treatment of wounds, the abolition of deadspace is one of the essential steps to obtain a good result, avoiding the accumulation of liquids that hinder the complete healing of the wound. This dead space can be eliminated through sutures, compressive bandages and the use of surgical drains, and the association between techniques can, and must, be used in some more severe cases (BABIES, 1999).

The most efficient way of draining a wound is by treating it openly, by second intention. Some wounds allow the approach by first or third intention, but with uncertainties about the degree of contamination and about the occlusion of the dead space, in which cases the use of drains is indicated. The most common causes of these uncertain wounds

are bites, lacerations, avulsions or extensive skin separations (MACPHAIL, 2015). Other indications for the use of drains are in cases of lesions with accumulation of fluid, whether seroma, blood or exudates, which cannot be removed only in the first drainage; when the wound cannot be completely debrided, which may lead to the production of undesirable fluids; or when the wound is in an advanced degree of contamination or infection, with the production of large amounts of exudate. The drains will eliminate dead space and fluid accumulation, reducing the chances of infection, when it is not already installed, and accelerating the healing process (BABIES, 1999).

Drainage techniques can be used on all types of wounds, from clean and clean-contaminated to contaminated and infected. However, it is important to emphasize that the elective treatment for infected wounds is carried out using the technique of second or third intention. In cases of clean and clean-contaminated wounds, systemic antibiotics can be used to reduce the chances of ascending infections (DOUGHERTY; SIMMONS, 1992). Drains do not act as a substitute for incorrect wound management or for avoiding a possible surgical procedure. Its use will have no result if the wound does not previously receive a successful washing, cleaning and debridement (MILLER, 2003). The use and inadequate management of drains can lead to ascending contamination by microorganisms from the external environment, so their placement and management must be done through aseptic techniques. Some care must be taken when choosing to use drains. The drain exit must not coincide with the suture line, so as not to predispose to dehiscence and compromise healing, therefore, another incision must be performed beside or close to the suture line for its exit. If the drain is passive, its outlet

must be at the lowest point in the affected area to ensure all gravity drainage (MILLER, 2003).

Drains can be divided into passive open or active closed. The former depend on gravity, on the different pressure gradients exerted on the wound or on the movements performed by the animal for the wound to drain, and are usually open, draining the exudate directly into the dressing. Active closed drains are more efficient as they drain fluids continuously through a negative pressure exerted by a closed mechanism capable of producing a vacuum in the drainage system (CAMPBELL, 2018).

PASSIVE DRAINS

They are generally more flexible than active drains and act as a function of gravity, constantly draining fluids to the external environment. One of its main functions is to establish a path of least resistance for the exit of the fluid that is formed by the wound, especially in cases where the fluid is very viscous, and which could present difficulty in being drained by active drains. 1992). They are more economical when compared to active drains, and generate less possibility of injury or trauma to adjacent tissues because they are more flexible. It is mainly indicated in wounds that produce less exudate, since they have an open drainage mechanism and would be unfeasible in cases of very high volumes, due to the need for several dressing changes. They must be installed in the ventral part of the wound, to facilitate drainage, and are not indicated for wounds located in the head or back, since the action of gravity can be difficult in these cases (CARNE, 2011).

The most used passive drain is the Penrose drain, characterized by a type of soft and flexible rubber. When applied to the wound, a dressing composed of gauze and bandages must be placed on its ventral end to absorb the expelled fluids and also to decrease the

possibility of ascending infection. The volume of drained fluid can usually be estimated by weighing the gauze and bandages before and after dressing change (DURAI et al., 2009). Not only the Penrose drain, but all passive drains must be protected with absorbent pads, and these must be changed daily to monitor the amount of fluid expelled and signs of inflammation or infection. Dressing changes must be performed aseptically, with gloves and sterile materials, and before applying the new dressing. The skin around the wound must be cleaned and subjected to antiseptics. Sterile fluids or emollients can be used to facilitate the removal of the dressing if it is very adhered to the wound (CARNE, 2011).

ACTIVE DRAINS

The drainage mechanism works by sucking fluids from a tube inserted into the wound, by different pressure gradients exerted by the vacuum created in the system, into a closed reservoir. This reservoir can be compressive, that is, it expands as it is completely occupied by fluids, or it can be rigid, already established in a defined shape and size (HALFACREE et al., 2009). They are generally more expensive than passive drains, but more efficient, as the risk of drain occlusion is lower due to the constant negative pressure and because they allow the drainage of large amounts of fluid with minimal need for dressing changes. This fact compensates for the higher price, because if a cheaper passive drain were used in a wound with a high production of exudates, the cost of dressings would be too much (CARNE, 2011). Active drains also have the possibility of measuring the amount of fluid expelled by the wound, as they are kept in a container until disposal and cleaning takes place. And this also helps in controlling ascending infections, as they remain closed throughout the drainage (MAKAMA; AMEH, 2008).

Even if active drains have a lower contamination rate, care must be taken during their maintenance. The use of sterile gloves must be recommended for the evaluation of the place where the drain is inserted, in search of possible irritations or infections, during the change of the occlusive dressing, which must remain in the drain outlet region, and for the emptying of the drain reservoir. The constant checking of the drain must be carried out, since the suction can be interrupted due to the loss of vacuum caused by the entry of air into the reservoir (CARNE, 2011).

FINAL CONSIDERATIONS

Several procedures must be performed, most of the time together, to always obtain the best prognosis and result regarding the treatment of tissue injuries.

The use of washing techniques and decontamination solutions, debridement, culture and sensitivity tests to antimicrobials, bandages, dressings and drains show us several possibilities for the most appropriate management of the wound, always looking for the best treatment plan and with the greatest speed in healing.

REFERENCES

- ATKIN, I. Understanding methods of wound debridement. *British Journal of Nursing*, v.23, n.12, p.10–15, 2014.
- AYELLO, E. A.; CUDDIGAN, J. E. Debridement: controlling the necrotic/cellular burden. *Advances in Skin and Wound Care*, v.17, n.2, p.66–75, 2004.
- BABIES, S. J. Surgical drains. In: FOWLER, D.; WILLIAMS, I. M. *BSAVA Manual of Canine and Feline Wound Management and Reconstruction*. British Small Animal Veterinary Association, 1999, p.47–55.
- BECO, L.; GUAGUERE, E.; MÉNDEZ, C. L.; NOLI, C.; NUTTAL, T.; VROOM, M. Suggested guidelines for using systemic antimicrobials in bacterial skin infections: part 1 - diagnosis based on clinical presentation, cytology and culture. *Veterinary Record*, v.172, n.3, p.72–78, 2013.
- BIANCHI, I. The cleansing of superficial traumatic wounds. *British Journal of Nursing*, v.9, n.19, p.28–38, 2000.
- BONHAM, P. A. Swab Cultures for Diagnosing Wound Infections. *Journal of Wound, Ostomy and Continence Nursing*, v.36, n.4, p.389–395, 2009.
- BOWLER, P. G.; DUERDEN, R. I.; ARMSTRONG, D. G. Wound Microbiology and Associated Approaches to Wound Management. *Clinical Microbiology Reviews*, v.14, n.2, p.244–269, 2001.
- CAMPBELL, B. G. Bandages and drains. In: JOHNSTON, S. A.; TOBIAS, K. M. *Veterinary Surgery Small Animal*. 2 ed. Elsevier, 2018, p.791–818.
- CARNE, H. How to manage wound drains. *The Veterinary Nurse*, v.2, n.9, p.540–543, 2011.
- DEVVEY, J. J.; LINKLATER, A.; KIRBY, R. Wounds and bandages. In: KIRBY, R.; LINKLATER, A. *Monitoring and Intervention for the Critically Ill Small Animal: The Rule of 20*. John Wiley & Sons, Inc, 2017, p.373–388.
- DHIVYA, S.; PADMA, V. V.; SANTHINI, E. Wound dressings – a review. *BioMedicine*, v.5, n.4, p.24–28, 2015.
- DIPHO, J. T.; EDMISTON, C. E.; BOHINEN, J. M. A. Pharmacodynamics of antimicrobial therapy in surgery. *The American Journal of Surgery*, v.171, n.6, p.615–622, 1996.
- DOUGHERTY, S. H.; SIMMONS, R. L. The biology and practice of surgical drains part I. *Current Problems in Surgery*, v.29, n.8, p.567–623, 1992.

- DOUGHERTY, S. H.; SIMMONS, R. L. The biology and practice of surgical drains part II. *Current Problems in Surgery*, v.29, n.9, p.643–730, 1992.
- DURAL, R.; MOWNAN, A.; PHILIP, C. H. N. Use of Drains in Surgery: A Review. *Journal of Perioperative Practice*, v.19, n.6, p.180–186, 2009.
- FALABELLA, A. E. Debridement and wound bed preparation. *Dermatologic Therapy*, v.19, n.6, p.317–325, 2006.
- GHOMI, E. R.; KHALILI, S.; KHORASANI, S. N.; NEISIANI, R. E.; RAMAKRISHNA, S. Wound dressings: Current advances and future directions. *Journal of Applied Polymer Science*, p.1–12, 2019.
- HALFACREE, Z. J.; WILSON, A. M.; BAINES, S. J. Evaluation of in vitro performance of suction drains. *American Journal of Veterinary Research*, v.70, n.2, p.283–289, 2009.
- HOSGOOD, G. Wound repair and specific tissue response to injury. In: SLATTER, D. *Textbook of Small Animal Surgery*. 3 ed. v. 1. Saunders, 2003, p.91–111.
- HOSGOOD, G. Open wounds. In: JOHNSTON, S. A.; TOBIAS, K. M. *Veterinary Surgery Small Animal*. 2 ed. Elsevier, 2018, p.3810–3839.
- JOHNSTON, D. E. Care of Accidental Wounds. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v.20, n.1, p.27–46, 1990.
- KIRSHEN, C.; WOO, K.; AYELLO, E. A.; SIBBALD, R. G. Debridement: a vital component of wound bed preparation. *Advances in Skin and Wound Care*, v.19, n.9, p.506–517, 2006.
- KRAHWINKEL, D. I.; BOOTHE, H. W. Topical and Systemic Medications for Wounds. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v.36, n.4, p.739–757, 2006.
- LAWRENCE, J. C. Wound irrigation. *Journal of Wound Care*, v.6, n.1, p.23–26, 1997.
- LIPSKEY, B. A.; HOEY, C. Topical Antimicrobial Therapy for Treating Chronic Wounds. *Clinical Infectious Diseases*, v.49, n.10, p.1541–1549, 2009.
- MACPHAIL, C. M. Cirurgia do Sistema Tegumentar. In: FOSSUM, T. W. *Cirurgia de Pequenos Animais*. 4 ed. Elsevier Editora Ltda, 2015, p.546–596.
- MAKAMA, J. G.; AMEH, E. A. Surgical Drains: What the Resident Needs To Know. *Nigerian Journal of Medicine*, v.17, n.3, p.244–250, 2008.
- MILLER, C. W. Bandages and drains. In: SLATTER, D. *Textbook of Small Animal Surgery*. 3 ed. v. 1. Saunders, 2003, p.244–249.
- O'BRIEN, M. Exploring methods of wound debridement. *British Journal of Community Nursing*, v.7, n.3, p.10–18, 2002.
- RAMUNDO, J.; GRAY, M. Enzymatic Wound Debridement. *Journal of Wound, Ostomy and Continence Nursing*, v.35, n.3, p.273–280, 2008.
- RESENDE, M. M. C.; ROCHA, C. A.; CORRÊA, N. F. M.; VEIGA, R. R. G.; PASSOS, S. I. E.; NOVO, N. E.; JULIANO, Y.; DAMASCENO, C. A. V. Tap water versus sterile saline solution in the colonisation of skin wounds. *International Wound Journal*, v.13, n.4, p.526–530, 2015.
- RODEHEAVER, G. T.; RATLIFF, C. R. Wound cleansing, wound irrigation, wound disinfection. In: KRASNER, D. I.; VAN RIJSWIJK, I. *Chronic Wound Care: The Essentials*. Malvern, 2018, p.47–62.
- SCHULTZ, G. S.; SIBBALD, R. G.; FALANGA, V.; AYELLO, E. A.; DOWSETT, C.; HARDING, K.; ROMANELLI, M.; STACEY, M. C.; VANSCHIEDT, W. Wound bed preparation: a systematic approach to wound management. *Wound Repair and Regeneration*, v.11, n.2, p.1–28, 2003.

- SINGH, A.; WEESE, J. S. Wound Infections and Antimicrobial Use. In: JOHNSTON, S. A.; TOBIAS, K. M. **Veterinary Surgery Small Animal**. 2 ed. Elsevier, 2018, p.530-548.
- STEED, D. I. Debridement. **The American Journal of Surgery**, v.187, n.5, p.71-74, 2004.
- SWAIM, S. F. Bandages and Topical Agents. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.20, n.1, p.47-65, 1990.
- VAN HENGEL, T.; TER HAAR, G.; KIRPENSTEIJN, J. Wound management: a new protocol for dogs and cats. In: KIRPENSTEIJN, G.; TER HAAR, G. **Reconstructive Surgery and Wound Management of the Dog and Cat**. Manson Publishing Ltd, 2013, p.21-48.
- VOWDEN, K. R.; VOWDEN, P. Wound debridement, Part 1: non-sharp techniques. **Journal of Wound Care**, v.8, n.5, p.237-240, 1999.
- VOWDEN, K. R.; VOWDEN, P. Wound debridement, Part 2: sharp techniques. **Journal of Wound Care**, v.8, n.6, p.291-294, 1999.
- WALDRON, D. R.; ZIMMERMAN-POPE, N. Superficial skin wounds. In: SLATTER, D. **Textbook of Small Animal Surgery**. 3 ed. v. 1. Saunders, 2003, p.284-298.
- WILLARD, M. D.; SCHULZ, K. S. Infecções Cirúrgicas e Seleção dos Antibióticos. In: FOSSUM, T. W. **Cirurgia de Pequenos Animais**. 4 ed. Elsevier Editora Ltda, 2015, p.269-294.
- WILLIAMS, J. M. Open wound management. In: FOWLER, D.; WILLIAMS, J. M. **BSAVA Manual of Canine and Feline Wound Management and Reconstruction**. British Small Animal Veterinary Association, 1999, p.37-47.
- WILSON, J. R.; MILLS, J. G.; PRATHER, I. D.; DIMITRIJEVICH, S. D. A Toxicity Index of Skin and Wound Cleansers Used on In Vitro Fibroblasts and Keratinocytes. **Advances in Skin & Wound Care**, v.18, n.7, p.373-378, 2005.

CAPÍTULO 3: Efeito do óleo de semente de uva (*Vitis vinifera*) na cicatrização de feridas cutâneas experimentais em ratos (*Rattus norvegicus*)

RESUMO

O óleo de semente de uva possui diversas funções que podem auxiliar na cicatrização, entre elas a ação antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana. Com isso, o objetivo do estudo foi avaliar seu efeito na cicatrização de feridas cutâneas experimentais em ratos por meio de avaliações macroscópica, histológica, imuno-histoquímica e por teste mecânico de tração. Foram utilizados 48 *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar, machos, com três meses de idade e peso médio de 300 g, divididos em dois grupos experimentais: grupo controle (n=24) - animais não tratados; e grupo uva (n=24) - animais tratados com óleo de semente da uva. Todos os animais foram submetidos a ressecção cirúrgica de dois segmentos completos de pele no formato circular com 12 mm de diâmetro, um realizado na região dorsal interescapular e o outro 30 mm caudal ao primeiro. Após o procedimento cirúrgico as feridas de ambos os grupos foram limpas com solução fisiológica uma vez ao dia até os tempos de avaliação. Nos animais do grupo controle não foi feita aplicação de medicamentos. Nos animais do grupo uva foi depositado 100 microlitros do óleo de semente da uva sobre as feridas, uma vez ao dia até os tempos de avaliação. As eutanásias foram realizadas aos 3, 7, 14 e 21 dias após o procedimento da indução da ferida, em 6 animais de cada grupo, para avaliação macroscópica da ferida, mensuração da área da ferida e potencial de contração; avaliação histológica, imuno-histoquímica e por teste mecânico de tração. A análise macroscópica e histológica revelou menor escore de crostas no grupo uva ao 7º dia de avaliação. Ainda na análise histológica, o grupo uva apresentou maior escore de deposição de colágeno no 14º dia de avaliação, juntamente com maior área de colágeno no 3º e 14º dia. Na análise imuno-histoquímica houve maior densidade integrada de pixels da proteína VEGF no 7º dia de avaliação no grupo do óleo de semente de uva, e no teste mecânico de tração, as amostras cutâneas do grupo tratado com o óleo apresentaram maior tensão quando comparadas com as do grupo controle. Portanto, o efeito do óleo de semente de uva foi benéfico na cicatrização de feridas, principalmente com relação à remoção de crostas, deposição de colágeno e angiogênese.

Palavras-chave: angiogênese, colágeno, óleo essencial, lesões cutâneas, reparação tecidual

ABSTRACT

Grape seed oil has several functions that can aid in healing, including antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial action. Therefore, the aim of the study was to evaluate the effect of grape seed oil on the healing of experimental skin wounds in rats through macroscopic, histological, immunohistochemistry and mechanical tensile testing evaluations. 48 *Rattus norvegicus* of Wistar lineage, males, three months of age and average weight of 300 g, were divided into two experimental groups: control group (n=24) - animals not treated (n=24) - animals treated with grape seed oil. All animals were submitted to surgical resection of two complete segments of skin in circular shape with 12 mm in diameter, one performed in the interscapular dorsal region and the other 3 cm caudal at the first. After the surgical procedure, the wounds were cleaned with saline solution once a day up to the evaluation times for both groups. In the animals of the control group no medication was used. In the animals of the grape group 100 microlitres was deposited over the wounds once a day up to the evaluation times. Euthanasia was performed at 3, 7, 14 and 21 days after the wound induction procedure in 6 animals of each group for macroscopic evaluation of the wound, measurement of the wound area and contraction potential; histological, immunohistochemical and mechanical traction test evaluation. Macroscopic and histological analysis revealed lower crust score in the grape group on the 7th day of evaluation. Also in histological analysis, the grape group presented a higher collagen score on the 14th day of evaluation, along with a larger area of collagen on the 3rd and 14th day. In the immunohistochemical analysis, there was a higher integrated density of pixels of the VEGF protein on the 7th day of evaluation in the grape seed oil group, and in the mechanical tensile test, the skin samples of the oil-treated group showed higher tension when compared to those of the control group. Therefore, the effect of grape seed oil was beneficial in wound healing, especially in relation to removal of crusts, collagen deposition and angiogenesis induction.

Keywords: angiogenesis, collagen, essential oil, skin lesions, tissue repair

INTRODUÇÃO

A medicina complementar tem se tornado cada vez mais popular nos últimos anos, inclusive com o acréscimo de diversos ingredientes botânicos nos tratamentos (BAUMANN, 2007). A fitoterapia, ou seja, o uso de plantas e vegetais para tratamento ou prevenção de doenças, colaboram para a cura de inúmeros sintomas e afecções (NAYAK *et al.*, 2010). Partindo desse princípio, o uso dessas plantas medicinais, principalmente a partir da extração de seus óleos, vêm sendo aplicado para o tratamento de diferentes tipos de feridas cutâneas (REKIK *et al.*, 2016).

As uvas têm sido utilizadas tradicionalmente para diversos tratamentos há milhares de anos por suas propriedades já conhecidas: antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e anticarcinogênica (ABE *et al.*, 2007; REKIK *et al.*, 2016). Além disso, também são utilizadas na indústria cosmética por sua propriedade antienvelhecimento e como estabilizadora de colágeno e elastina (BAUMANN, 2007).

Estima-se que de toda a produção global das uvas, cerca de 80% seja designada para a fabricação de vinhos, sendo que a casca e as sementes são descartadas após o processo de vinificação (TROST *et al.*, 2016). Por isso, o óleo de semente de uva é tipicamente extraído por prensagem fria dessas sementes utilizadas na fabricação do vinho (AL BAYATI; ENAAD, 2013). Cada semente de uva contém de 8 a 20% de óleo em sua composição (ROMBAUT *et al.*, 2015), e devido ao seu descarte no processo de vinificação, esse subproduto acaba se tornando uma excelente fonte rentável e de uso eficiente (AL BAYATI; ENAAD, 2013).

Suas sementes são ricas em compostos fenólicos com ação antioxidante, como as catequinas, epicatequinas, proantocianidinas, resveratrol e ácido gálico, além da vitamina E, outro composto com a mesma função (PRIEUR *et al.*, 1994; KRISHNA *et al.*, 2001; SHI *et al.*, 2003; ROMBAUT *et al.*, 2013). O interesse do uso dessas substâncias antioxidantes naturais no tratamento de feridas vem crescendo, devido a sua eficácia no combate do estresse oxidativo, que acaba retardando o processo cicatricial (FITZMAURICE *et al.*, 2011). Esse combate se dá através da remoção das espécies reativas de oxigênio (EROs) em excesso, que são produzidos naturalmente por qualquer organismo através de processos metabólicos oxidativos em situações da necessidade de ativação do sistema imunológico (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004), e, portanto, estão presentes nas feridas cutâneas (GARAVAGLIA *et al.*, 2016).

Essa alta capacidade antioxidante se dá pela presença de grandes quantidades de compostos fenólicos e outras substâncias presentes na semente da uva que possuem essa mesma função, podendo levar a um resultado de sinergismo entre suas ações (KHURANA *et al.*, 2013), atenuando o estresse oxidativo da ferida.

Em um estudo realizado por Xia *et al.* (2010), foi comparada a capacidade antioxidante presente nos subprodutos da uva pela mensuração da absorção de radicais livres de oxigênio, sendo que a maior capacidade foi encontrada na semente quando comparado com os outros subprodutos testados, sendo eles a casca, folha e vinho.

Os compostos fenólicos, principalmente os polifenóis, além de atuarem como antioxidantes, também apresentam ação anti-inflamatória por atuarem inibindo a ação da ciclooxigenase e ácido araquidônico, com consequente inibição da produção de fatores inflamatórios como leucotrienos e prostaglandinas, aliviando sintomas de inflamação e dor exacerbados (SANTANGELO *et al.*, 2007; VIEIRA *et al.*, 2008).

Acrescido à sua atividade anti-inflamatória, os compostos fenólicos também possuem ação antibacteriana por inibirem a enzima hialuronidase. Essa enzima é capaz de hidrolisar o ácido hialurônico, que tem dentre suas funções manter determinadas células do corpo unidas. Dessa forma, quando ocorre a hidrólise desse ácido as células do corpo deixam de trabalhar como um arcabouço protetor, permitindo a proliferação bacteriana pelo organismo (VIEIRA *et al.*, 2008; TORTORA *et al.*, 2010).

Além disso, no estudo realizado por Rotava *et al.* (2009) com o objetivo de determinar a atividade antibacteriana, antioxidante e tanante dos subprodutos da uva *in vitro*, obteve-se como resultado alta atividade antibacteriana contra cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Essa ação antibacteriana pode ser atribuída especialmente ao resveratrol, um polifenol, por induzir dano oxidativo à membrana bacteriana, principalmente da *Escherichia coli*, sem lesar as células do hospedeiro (SUBRAMANIAN *et al.*, 2014).

As proantocianidinas, além de possuírem ação antioxidante, anti-inflamatória e antibacteriana, possuem ação anticarcinogênica e antialérgica (MIDDLETON, 1998), demonstrando ter significantes propriedades que podem beneficiar no tratamento de feridas cutâneas (SHI *et al.*, 2003). Além das proantocianidinas, outros taninos presentes nas sementes da uva possuem ação antifúngica, hemostática, e quando usados em tratamento de feridas formam uma camada protetora ao longo do tecido lesionado, impermeabilizando-o (MONTEIRO *et al.*, 2005).

Os compostos lipofílicos presentes na semente da uva, além da vitamina E, são os ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) e monoinsaturados (MUFAs). O principal PUFA presente no óleo de semente de uva é o ácido linoleico, representando de 60 a 75,3% de todos os ácidos graxos; já o principal MUFA é o ácido oleico, com 13,9 a 21,9% (LUTTERODT *et al.*, 2011). Por sua característica oleosa, os PUFAs e MUFAs atuam na cicatrização como uma barreira protetora contra microrganismos, desidratação tecidual, e traumatismos no local da lesão (HATANAKA; CURI, 2007).

Os fitoesteróis, outros compostos lipofílicos, também atuam na prevenção da liberação de mediadores inflamatórios, diminuindo essa resposta que em escala exacerbada é prejudicial à cicatrização (SHINAGAWA *et al.*, 2015).

OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do óleo de semente de uva na cicatrização de feridas cutâneas experimentais em ratos (*Rattus norvegicus*).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar se o óleo de semente de uva favorece a reparação tecidual por meio de análise macroscópica, avaliação da área da ferida e potencial de contração.

Avaliar se o óleo de semente de uva favorece a reparação tecidual por meio de análise histológica (histomorfometria) de células inflamatórias, epitelização, angiogênese, tecido de granulação, deposição de colágeno, presença de crostas, fibroplasia e área do colágeno.

Avaliar se o óleo de semente da uva favorece a angiogênese por meio de análise imuno-histoquímica pela marcação da proteína VEGF.

Avaliar a qualidade do tecido reparado por meio do teste mecânico de tração.

MATERIAL E MÉTODOS

Normas éticas

Todo o experimento foi conduzido de acordo com as normas do Colégio Brasileiro para Experimentação Animal (COBEA), após aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade de Uberaba (007/2021). O projeto foi realizado no biotério da Universidade de Uberaba para a realização das intervenções cirúrgicas, análises macroscópicas, eutanásia e coleta das amostras. As avaliações histológicas foram realizadas na Universidade Federal do Espírito Santo. As avaliações imuno-histoquímicas e do teste mecânico de tração foram realizadas no Laboratório de Histologia e Laboratório de Análises Mecânicas da Universidade de Uberaba, respectivamente.

Animais

Foram utilizados 48 *Rattus norvegicus* de linhagem Wistar, machos, com três meses de idade e peso médio de 300g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Uberlândia com certificação de ausência de ectoparasitas e endoparasitas. Os animais foram mantidos no Biotério Experimental da Universidade de Uberaba, alojados em caixas com seis animais cada, sob condições de umidade e temperatura controladas, fotoperíodo de 12 horas, recebendo ração comercial para roedores (Nuvilab CR-1[®], Nuvital Nutrientes S/A, Brasil) e água *ad libitum*.

Grupos experimentais

Os ratos foram aleatoriamente divididos em dois grupos experimentais: grupo controle, animais submetidos a confecção da ferida cirúrgica sem o tratamento tópico do óleo de semente de uva (n = 24 animais); grupo uva, animais submetidos a confecção da ferida cirúrgica com o tratamento tópico do óleo de semente de uva (n = 24 animais). Ambos os grupos foram divididos em 4 subgrupos contendo 6 animais cada de acordo com os tempos de avaliação: 3^o, 7^o, 14^o e 21^o dia após o procedimento cirúrgico, sendo considerado como 0 o dia da indução das lesões.

Indução da lesão

As intervenções cirúrgicas para confecção da ferida foram realizadas na sala de cirurgia do biotério da Universidade de Uberaba. Foram administrados o cloridrato de cetamina (Cetamin[®] 10%, Syntec, Brasil) na dose de 2 mg/kg e morfina (Dimorf[®] 10mg/mL, Cristália, Itapira, SP, Brasil) na dose de 2 mg/kg, ambos por via intraperitoneal (IP) na mesma seringa. Após isso, os animais foram induzidos e mantidos sob anestesia

geral pela inalação espontânea de isoflurano (Sevocris[®] 100%, Cristália, Brasil), diluído em oxigênio puro, ambos fornecidos por máscara. Com os animais anestesiados, foi realizada a tricotomia dorsal estendendo-se da região cervical até a lombosacral. Os animais foram posicionados em decúbito ventral e o campo operatório foi preparado de forma asséptica com soluções à base de clorexidina degermante a 2% (Rioher[®] 2%, Rioquímica, Brasil) e alcoólica a 0,5% (Riohex[®] 0,5%, Rioquímica, Brasil). Em seguida realizou-se a ressecção de dois segmentos completos de pele de formato circular com 12 mm de diâmetro, sendo um realizado na região dorsal interescapular e o outro 30 mm caudal ao primeiro (Figura 1). Após a cirurgia, os animais receberam tramadol (Tramadol[®], Cristália, Brasil) na dose de 10 mg/kg via subcutânea (SC), que foi repetido a cada 24 horas durante três dias consecutivos. No grupo controle, as feridas cirúrgicas foram limpas somente com solução fisiológica uma vez ao dia até os tempos de avaliação. Nos animais do grupo uva, além da limpeza com solução fisiológica, foi depositado 100 microlitros do óleo de semente da uva puro (Distriol, Brasil) sobre as feridas cirúrgicas a cada 24 horas até os tempos de avaliação.

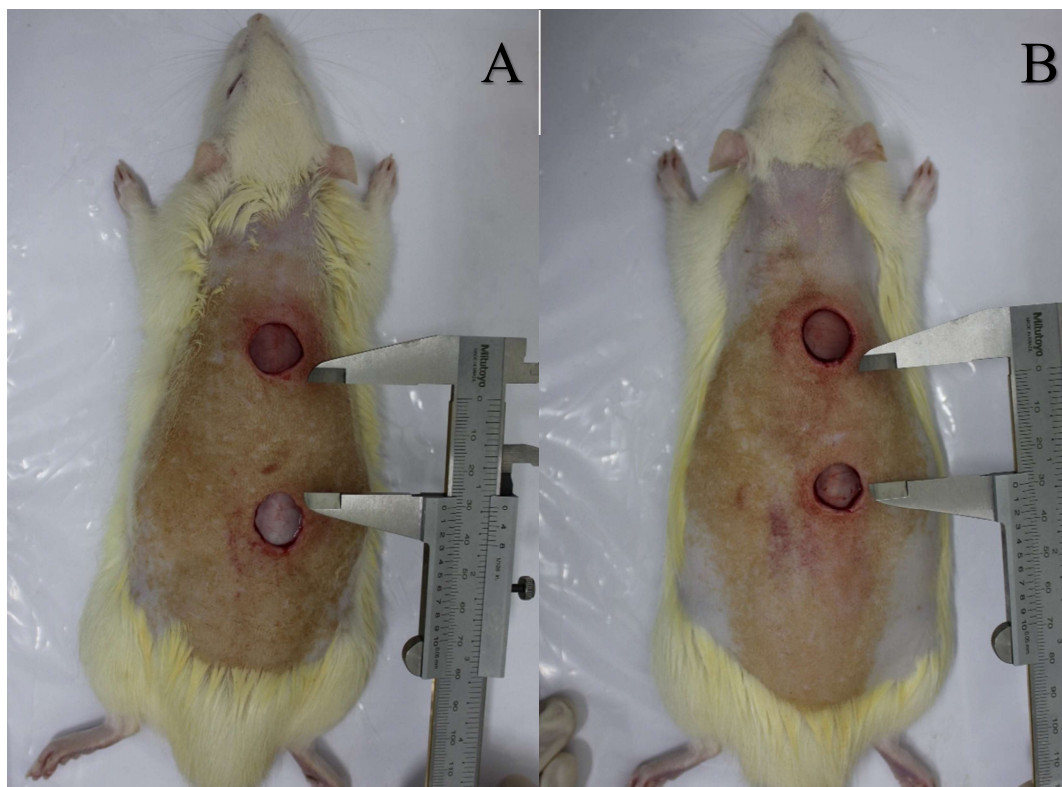


Figura 1 – Fotografia após procedimento cirúrgico (dia 0) de ressecção de dois segmentos completos de pele de formato circular com 12 mm de diâmetro, sendo um realizado na região dorsal interescapular e o outro 30 mm caudal ao primeiro em ratos (*Rattus norvegicus*) pertencentes ao grupo não tratado (A) e tratado com óleo de semente de uva (B).

Avaliação macroscópica da ferida

As feridas foram avaliadas macroscopicamente, por um único avaliador, no 3º, 7º, 14º e 21º dia de pós-operatório quanto à presença de secreção (ausente [0], discreto [1], moderado [2], acentuado [3]); presença de prurido (ausente [0], discreto [1], moderado [2], acentuado [3]) - a presença de escoriações e/ou arranhaduras mostram que os animais coçaram o local com os membros pélvicos; coloração do leito da ferida (róseo [0], avermelhado [1], amarelado [2] ou enegrecido [3]; presença de crostas (ausente [0], discreto [1], moderado [2], acentuado [3]); e epitelização (ausência de epitelização [0]; epitelização de 1/3 da ferida [1]; epitelização de 2/3 da ferida [2]; epitelização completa [3]). A atribuição dos escores foi utilizada de acordo com o trabalho de Greca *et al.* (2000) (Tabela 1).

Tabela 1 - Classificação utilizada para avaliação macroscópica de feridas experimentais em ratos não tratados (controle) e tratados com óleo de semente de uva aos 3, 7, 14 e 21 dias após a lesão.

Parâmetros	0	1	2	3
Secreção	Ausente	Discreto	Moderado	Acentuado
Prurido	Ausente	Discreto	Moderado	Acentuado
Coloração do leito	Róseo	Avermelhado	Amarelado	Enegrecido
Crostas	Ausente	Discreto	Moderado	Acentuado
Epitelização	Sem epitelização	Epitelização de 1/3 da ferida	Epitelização de 2/3 da ferida	Epitelização completa

Fonte: elaborado pelos autores com base em Greca *et al.* (2000).

Avaliação da área da ferida e potencial de contração

As medidas da área da ferida foram realizadas no dia do procedimento de confecção das mesmas, denominado como 0, e no 3º, 7º, 14º e 21º dia de pós-operatório. As feridas foram fotografadas com máquina fotográfica digital (Canon EOS 550D), mantida a uma distância constante (30 cm) da área cirúrgica. As imagens foram transferidas para um computador e analisadas através do software ImageJ® (National Institutes of Health, EUA) para a mensuração da área da ferida cutânea através da ferramenta do polígono, tendo o paquímetro como referência para calibrar a imagem, e transformadas em medida decimal. Após a mensuração da área, foi calculado o potencial de contração (PC) das feridas pela fórmula proposta por Oliveira *et al.* (2000): $PC = [(AF - AI) \times 100] / AI$, onde AI é a área inicial da ferida e AF a área final da ferida.

Eutanásia e coleta de amostras

As eutanásias foram realizadas no 3º, 7º, 14º e 21º dia de pós-operatório em 6 animais de cada grupo. O procedimento foi realizado através do aprofundamento do plano anestésico com sobredose de isoflurano.

As amostras cutâneas colhidas no 3º, 7º e 14º dias se constituíram da cicatriz ou lesão cutânea, com margem de 2 mm de pele em torno da lesão, com profundidade até a musculatura dorsal para as avaliações histológicas e imuno-histoquímicas.

No 21º dia foram colhidas três amostras de cada animal. A ferida cranial, com margem de 2 mm de pele em torno da lesão, foi utilizada para as avaliações histológicas. As duas outras amostras foram retiradas para o teste mecânico de tração com formato retangular, de 70 mm de comprimento por 20 mm de largura, da região dorsal no sentido transversal do eixo longitudinal do animal. Uma delas foi centralizada na lesão/cicatriz caudal e uma na pele íntegra imediatamente caudal à primeira.

Avaliação histológica e imuno-histoquímica

As avaliações histológicas foram realizadas no 3º, 7º, 14º e 21º dia de pós-cirúrgico. As amostras de pele foram fixadas em formaldeído 10% por 24 horas, e em seguida desidratadas nos banhos de álcool em concentrações crescentes (50%, 60%, 70%, 80%, 90% e 100%) por uma hora cada. Após a desidratação, foram diafanizadas com o tratamento em xilol diluído e xilol puro (40 minutos cada), seguidas da inclusão em blocos de parafina e obtenção dos cortes histológicos de 4µm de cada bloco através do micrótomo (Micron® HM315, Swerdlick Medical Systems, EUA). Os cortes foram corados pela técnica de hematoxilina-eosina (HE) e tricrômico de masson (TM), e avaliados descritivamente por microscopia óptica. A avaliação histológica com a coloração HE foi feita nos aumentos de 2, 4, 10 e 20x, observando células inflamatórias, epitelização, angiogênese, tecido de granulação, deposição de colágeno e presença de crostas. A avaliação histológica com a coloração TM foi feita no aumento de 4x observando fibroplasia. A leitura com as duas colorações foi subjetiva e às cegas, sendo descrito a distribuição e intensidade de cada lâmina e depois gerado um escore, que se baseou multiplicando a distribuição (focal [1]; multifocal [2]; difuso [3]) pela intensidade (ausente [0]; discreto [1]; moderado [2]; acentuado [3]) para células inflamatórias, angiogênese, tecido de granulação, deposição de colágeno, presença de crostas e fibroplasia. Para a avaliação da epitelização foi feito baseando-se somente na intensidade (ausência de epitelização [0]; epitelização de 1/3 da ferida [1]; epitelização de 2/3 da ferida [2]; epitelização completa [3]). Os escores se basearam de acordo com o trabalho de Santos *et al.* (2002) (Tabela 2). Ainda na avaliação histológica com a coloração TM, as lâminas foram fotografadas e analisadas pelo software de análise de imagem ImageJ® (National Institutes of Health, EUA), sendo que para cada imagem quantificada, a porcentagem da área do colágeno foi subtraída do *background*.

Tabela 2 - Classificação utilizada para a análise histológica de feridas experimentais em ratos não tratados (controle) e tratados com óleo de semente de uva aos 3, 7, 14 e 21 dias após a lesão.

Categoria		Escore	Especificações
Células inflamatórias	3	Acentuado	Acentuada proliferação de células inflamatórias
	2	Moderado	Moderada proliferação de células inflamatórias
	1	Discreto	Discreta proliferação de células inflamatórias
	0	Ausente	Ausência de células inflamatórias
Epitelização	3		Epitelização completa
	2		Epitelização de 2/3 da ferida
	1		Epitelização de 1/3 da ferida
	0		Ausência de epitelização
Angiogênese	3	Acentuado	Acentuada neovascularização
	2	Moderado	Moderada neovascularização
	1	Discreto	Discreta neovascularização
	0	Ausente	Ausência de neovascularização
Tecido de granulação	3	Acentuado	Acentuada quantidade de tecido de granulação
	2	Moderado	Moderada quantidade de tecido de granulação
	1	Discreto	Discreta quantidade de tecido de granulação
	0	Ausente	Ausência de tecido de granulação
Deposição de colágeno	3	Acentuado	Acentuada deposição de colágeno
	2	Moderado	Moderada deposição de colágeno
	1	Discreto	Discreta deposição de colágeno
	0	Ausente	Ausência de colágeno

Crostras	3	Acentuado	Acentuada presença de crostras
	2	Moderado	Moderada presença de crostras
	1	Discreto	Discreta presença de crostras
	0	Ausente	Ausência de crostras
Fibroplasia	3	Acentuado	Acentuada fibroplasia
	2	Moderado	Moderada fibroplasia
	1	Discreto	Discreta fibroplasia
	0	Ausente	Ausência de fibroplasia

Fonte: Adaptado de Santos *et al.* (2002).

As avaliações imuno-histoquímicas foram realizadas no 3º, 7º e 14º dia de pós-operatório para marcação do Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) para caracterizar o estímulo à neovascularização. Foi utilizado o anticorpo primário anti-VEGF (VEGF Antibody (C-1)[®]: sc-7269, Santa Cruz Biotechnology, EUA) na diluição 1:100 para avaliação de sua expressão no tecido cutâneo de ratos. As lâminas foram mantidas em estufa a 55°C durante 24 horas para fixação. Foram colocadas em xilol para serem desparafinadas, em concentrações decrescentes de álcool (100% e 95%) para hidratação e imersas em PBS. Em seguida, foi feito o bloqueio das peroxidases endógenas em solução de metanol e peróxido de hidrogênio (3%) por 10 minutos, e bloqueio de proteínas inespecíficas em leite em pó desnatado 3% (Molico[®], Nestlé, Brasil) diluído em água destilada por 60 minutos. Os cortes foram incubados por 18 horas (overnight) a 4°C, em câmara úmida e escura, com o anticorpo primário. No dia seguinte, após lavagem com PBS, o anticorpo secundário (N-Histofine[®] Simple Stain Rat MAX PO (M), Nichirei Biosciences Inc., JP) foi adicionado, os cortes foram incubados por 30 minutos em temperatura ambiente e posteriormente lavados em PBS. As reações foram reveladas com 3-3' diaminobenzidina (DAB) (DAB Chromogen[®], ScyTek Laboratories, EUA) por 5 minutos, lavadas em água destilada e contra coradas com hematoxilina de Harris. Após estas etapas, procedeu-se a desidratação padrão em concentrações crescentes de álcool (95% e 100%), e montagem das lâminas com lamínulas e resina sintética. As lâminas marcadas por esse anticorpo foram fotografadas e analisadas pelo software de análise de imagem ImageJ[®] (National Institutes of Health, EUA), sendo que para cada imagem quantificada, a média da densidade integrada de pixels foi subtraída do *background*.

Teste mecânico de tração

A avaliação mecânica foi realizada no 21º dia de pós-operatório, e para isso foram colhidas duas amostras de pele de cada animal. As amostras possuíam formato retangular, com 70 mm de comprimento por 20 mm de largura, e foram colhidas da região dorsal no sentido transversal do eixo longitudinal do animal, sendo que uma delas foi centralizada na lesão/cicatriz caudal e uma na pele íntegra imediatamente caudal à primeira. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos individuais, imersas em solução fisiológica e mantidas congeladas a -20°C até o dia da realização dos testes. Os ensaios de tração foram realizados na máquina universal de ensaios (EMIC®, DL-3000) com célula de carga de 2000 N e velocidade de deslocamento de 0,3mm/s. Para confecção dos corpos de prova, as amostras foram descongeladas à temperatura ambiente e recortadas a fim de proporcionar-lhes uma conformação de ampulheta, cujo centro apresentasse 2 mm de largura. No momento do teste, a espessura de cada corpo de prova foi aferida, sendo a medida tomada no centro da ampulheta utilizando-se um paquímetro. Em cada ensaio, um corpo de prova foi posicionado entre as garras e, com o uso do software, foram mensuradas a força máxima observada (N) e o esforço à tensão (MPa) (Figura 2).

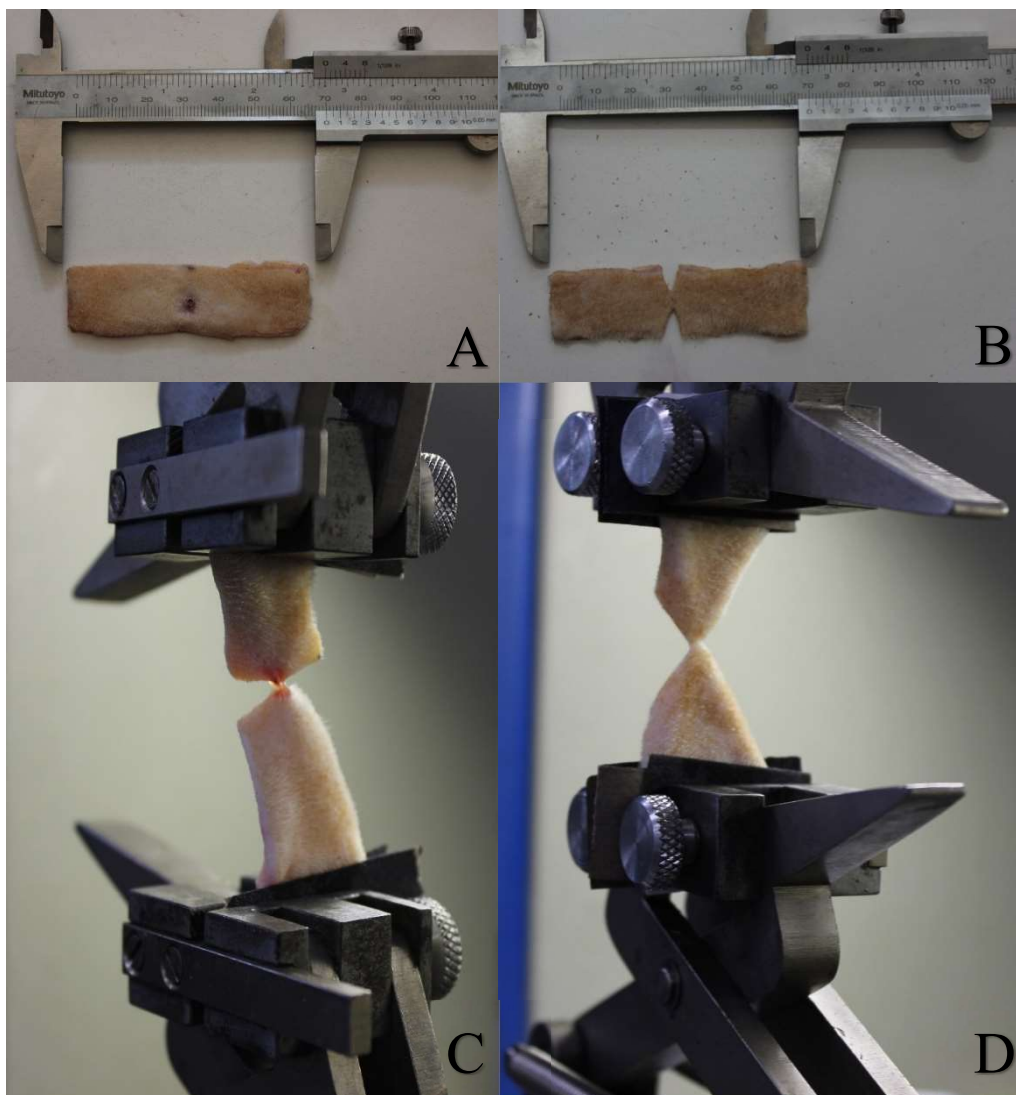


Figura 2 – Fotografia das amostras de pele colhidas no 21º dia após a lesão, de formato retangular, com 70 mm de comprimento por 20 mm de largura colhidas da região dorsal no sentido transversal do eixo longitudinal do animal, sendo que uma delas foi centralizada na lesão/cicatriz (A) e uma na pele íntegra. Antes do início do teste mecânico, foram recortadas a fim de proporcionar-lhes uma conformação de ampulheta, cujo centro apresentasse 2 mm de largura (B). Amostras posicionadas na máquina universal de ensaios, uma delas centralizada na lesão/cicatriz (C) e outra na pele íntegra (D).

Análise estatística

O delineamento foi inteiramente casualizado, fatorial 2 x 4 para as avaliações macroscópicas e histológicas, com dois grupos experimentais (controle e uva) e quatro tempos de avaliação (3, 7, 14 e 21 dias pós-operatório); fatorial 2 x 3 para a imuno-histoquímica, com dois grupos experimentais (controle e uva) e três tempos de avaliação (3, 7 e 14 dias pós-operatório); fatorial 2 x 1 para o teste mecânico de tração, com dois grupos experimentais (controle e uva) e um tempo de avaliação (21 dias pós-operatório). Os dados paramétricos referentes a área da ferida, potencial de contração, área do colágeno, imuno-histoquímica e teste mecânico de tração foram submetidos ao teste de

normalidade Shapiro Wilk. Foram calculadas as médias e desvios padrão dos dois grupos em cada tempo de avaliação estabelecido para cada teste. As médias foram comparadas pelo teste T de Student. Para os dados não paramétricos referentes aos escores de avaliação macroscópica e histológica, foram gerados gráficos e calculadas as medianas e as distâncias interquartílicas. As medianas dos grupos foram comparadas em cada tempo de avaliação pelo teste de Mann Whitney. Todas as análises estatísticas foram realizadas no GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) adotando um nível de 95% de confiança, considerando diferenças significativas se $p < 0,05$ (SAMPAIO, 1998).

RESULTADOS

Os animais se recuperaram bem no pós-operatório e não tiveram complicações que pudessem comprometer o resultado do estudo.

Avaliação macroscópica da ferida

Os escores de secreção e prurido foram 0 em todos os tempos de avaliação nos dois grupos. Aos 3 dias após a lesão foi observado presença de crostas, coloração do leito avermelhado e ausência de epitelização em ambos os grupos, controle e uva. Aos 7 dias, todo o grupo controle apresentava a ferida coberta por crostas, enquanto no grupo do óleo de semente de uva 3 animais apresentaram ausência de crostas, com visualização do tecido de granulação. A coloração do leito permaneceu avermelhada, com epitelização de 1/3 da ferida.

No 14º dia após a lesão, os animais apresentaram leito de coloração avermelhada e epitelização de 2/3 da ferida. No 21º dia, 2 animais do grupo controle e 5 animais do grupo uva apresentaram epitelização completa (Figura 3).

A partir do 7º dia, houve discreto crescimento de pelo no grupo controle, e moderado crescimento no grupo uva, principalmente nas regiões próximas à aplicação do óleo. No 14º e 21º dia houve o crescimento de pelo de forma acentuada no grupo uva, e moderada no grupo controle.

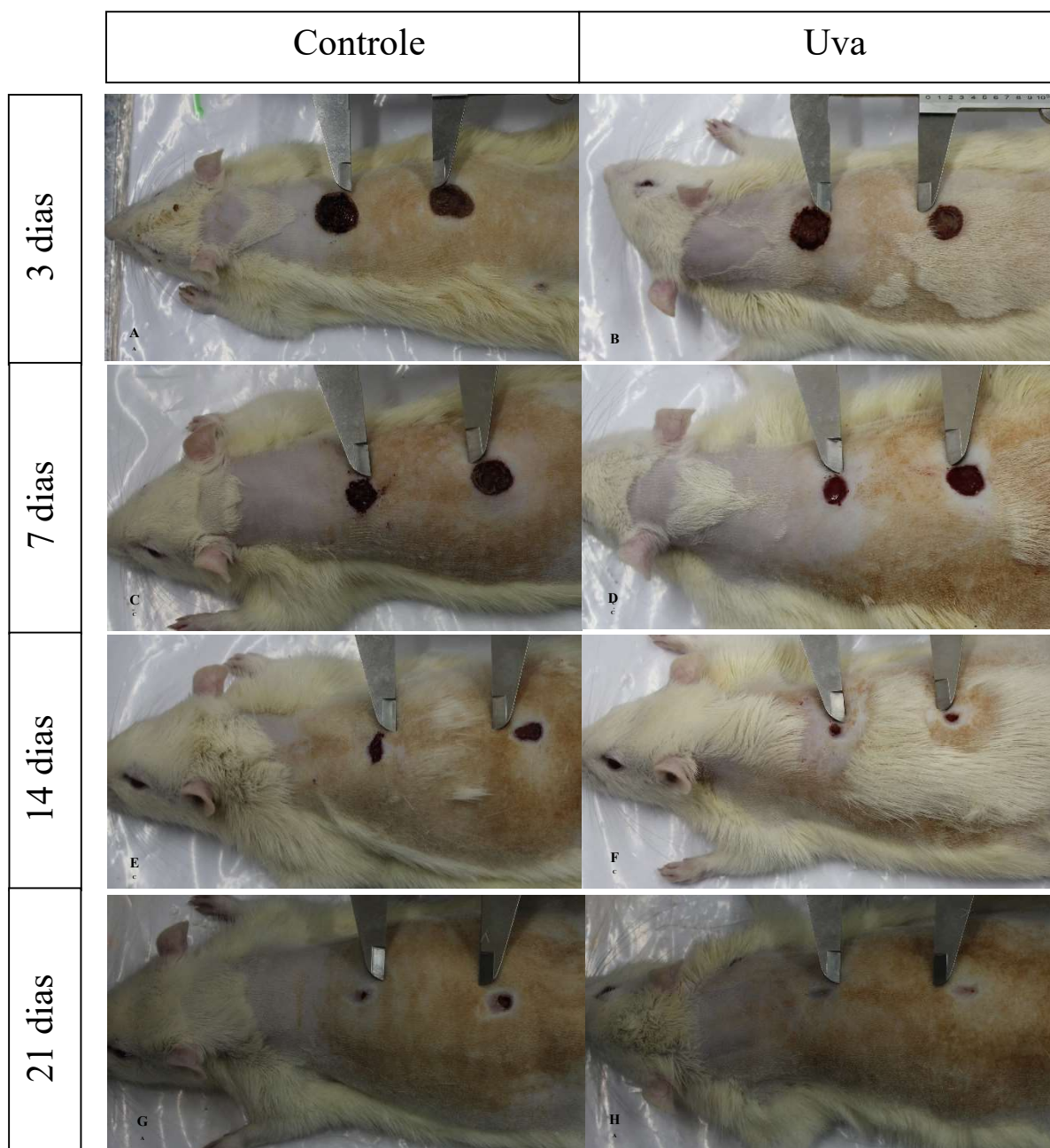


Figura 3 – Fotografias obtidas durante a análise macroscópica das feridas cutâneas experimentais em ratos não tratados (controle) e tratados com óleo de semente de uva (uva) aos 3, 7, 14 e 21 dias após a lesão. Observar presença de crostas no 3 e 7º dia (A, B e C); presença de tecido de granulação (D, E e F); processo cicatricial avançado a partir do 14º dia (E, F e G); epiteliação completa no 21º dia (H). Paquímetro utilizado como referência para calibrar a distância entre as duas feridas (30mm).

Na avaliação macroscópica, foi obtido menor escore quanto a presença de crostas no grupo tratado com óleo de semente de uva no 7º dia quando comparado ao grupo controle no mesmo tempo de avaliação ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa entre os outros escores e tempos de avaliação (Tabela 3 e Figura 4).

Tabela 3 - Mediana e distância interquartílica dos escores obtidos na avaliação macroscópica de feridas experimentais em ratos não tratados (controle) e tratados com óleo de semente de uva (uva) aos 3, 7, 14 e 21 dias após a lesão.

	Dia 3		Dia 7		Dia 14		Dia 21	
	Controle	Uva	Controle	Uva	Controle	Uva	Controle	Uva
Coloração do leito	1,00 ^a (0)	1,00 ^a (0)	1,00 ^a (0)	1,00 ^a (0)	1,00 ^a (0)	1,00 ^a (0)	1,00 ^a (1,00)	0 ^a (1,00)
Crostas	1,00 ^a (0)	1,00 ^a (1,00)	2,00 ^a (1,00)	0,50 ^b (1,00)	0 ^a (0)	0 ^a (0)	0 ^a (0)	0 ^a (0)
Epitelização	0 ^a (0)	0 ^a (0)	1,00 ^a (0)	1,00 ^a (0)	2,00 ^a (0)	2,00 ^a (0)	2,00 ^a (0,75)	2,50 ^a (1,00)

^aNas linhas – medianas com letra minúscula diferentes diferem pelo teste não paramétrico Mann-Whitney ($p < 0,05$). Comparação entre animais não tratados (controle) e tratados com o óleo de semente de uva (uva) para cada tempo de avaliação.

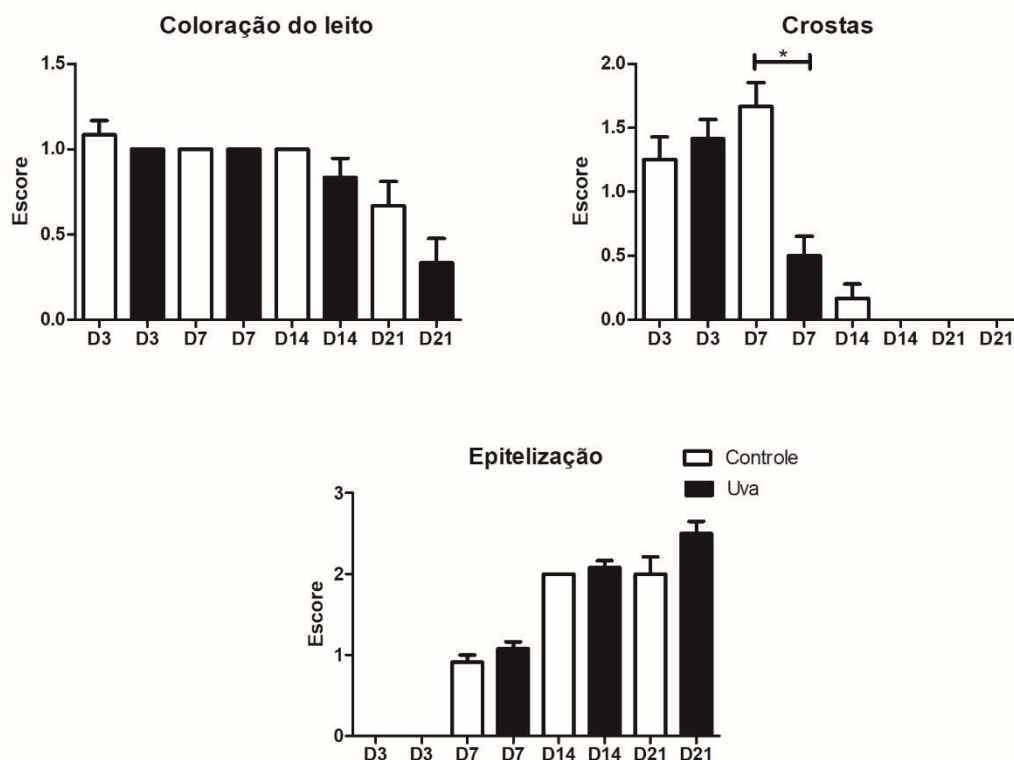


Figura 4 - Mediana e distância interquartílica dos escores obtidos na avaliação macroscópica de feridas experimentais em ratos não tratados (controle) e tratados com óleo de semente de uva (uva) aos 3, 7, 14 e 21 dias após a lesão. * Diferem pelo teste não paramétrico Mann-Whitney ($p < 0,05$).

Avaliação da área da ferida e potencial de contração

Foi obtida menor área da ferida em ambos os grupos, controle e uva, no 7°, 14° e 21° dia quando comparadas com a área do dia da confecção das lesões (dia 0) dentro do mesmo grupo ($p<0,05$) (Tabela 4 e Figura 5). Não houve diferença significativa entre os dois grupos em todos os tempos de avaliação.

Tabela 4 - Média e desvio padrão da área (mm) das feridas experimentais em ratos não tratados (controle) e tratados com óleo de semente de uva (uva) mensuradas no dia do procedimento cirúrgico (dia 0) e no 3°, 7°, 14° e 21° dia após a lesão.

	D0	D3	D0	D7	D0	D14	D0	D21
Controle	158,5 ^{aA} (16,88)	147,5 ^{aA} (14,59)	130,4 ^{aA} (18,01)	79,9 ^{7bA} (19,50)	130,0 ^{aA} (20,45)	13,19 ^{bA} (11,56)	157,7 ^{aA} (36,32)	14,95 ^{bA} (36,21)
Uva	146,5 ^{aA} (23,59)	135,0 ^{aA} (22,55)	124,8 ^{aA} (14,16)	72,35 ^{bA} (21,45)	135,9 ^{aA} (23,33)	12,04 ^{bA} (10,59)	135,7 ^{aA} (24,58)	0,60 ^{bA} (0,86)

^aNas linhas – médias com letra maiúscula diferentes diferem pelo teste T pareado ($p<0,05$). Comparação dentro do mesmo grupo para animais não tratados (controle) e tratados com o óleo de semente de uva (uva) para cada tempo de avaliação.

^ANas colunas – médias com letra minúscula diferentes diferem pelo teste T não pareado ($p<0,05$). Comparação entre animais não tratados (controle) e tratados com o óleo de semente de uva (uva) para cada tempo de avaliação.

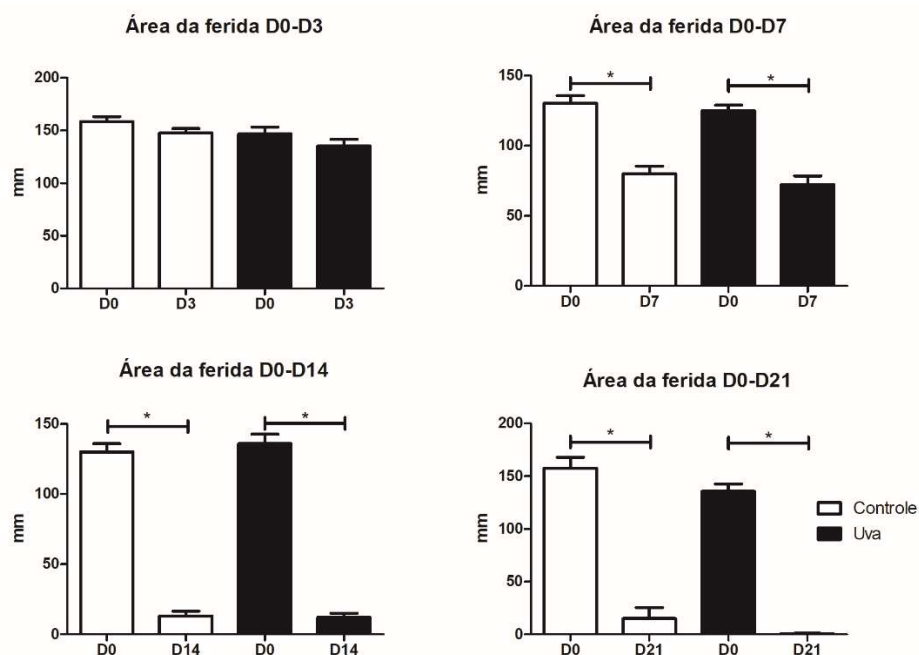


Figura 5 - Média e desvio padrão da área (mm) das feridas experimentais em ratos não tratados (controle) e tratados com óleo de semente de uva (uva) mensuradas no dia do procedimento cirúrgico (dia 0) e no 3°, 7°, 14° e 21° dia após a lesão. *Diferem pelo teste T não pareado ($p<0,05$).

Não houve diferença significativa entre os grupos em todos os tempos de avaliação quanto ao potencial de contração (Tabela 5 e Figura 6).

Tabela 5 – Média e desvio padrão do potencial de contração (%) das feridas experimentais em ratos não tratados (controle) e tratados com óleo de semente de uva (uva) aos 3, 7, 14 e 21 dias após a lesão.

	Dia 3		Dia 7		Dia 14		Dia 21	
	Controle	Uva	Controle	Uva	Controle	Uva	Controle	Uva
Média ± (desvio padrão)	-6,80 ^a (4,55)	-7,89 ^a (3,86)	-39,61 ^a (17,99)	-41,90 ^a (16,84)	-89,72 ^a (9,09)	-90,64 ^a (8,95)	-89,27 ^a (27,03)	-99,53 ^a (0,65)

^aNas linhas – médias com letra minúscula diferentes diferem pelo teste T não pareado ($p < 0,05$). Comparação entre animais não tratados (controle) e tratados com o óleo de semente de uva (uva) para cada tempo de avaliação.

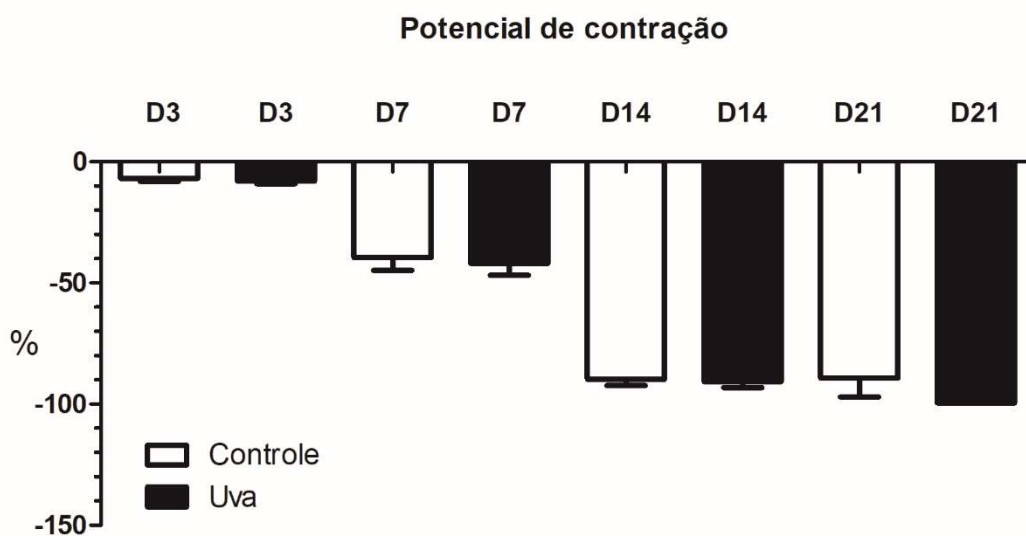


Figura 6 - Média e desvio padrão do potencial de contração (%) das feridas experimentais em ratos não tratados (controle) e tratados com óleo de semente de uva (uva) aos 3, 7, 14 e 21 dias após a lesão. * Diferem pelo teste T não pareado ($p < 0,05$).

Avaliação histológica e imuno-histoquímica

Aos 3 dias após a lesão, na avaliação histológica com HE, foi observada intensa proliferação de células inflamatórias no grupo controle, e predominância de moderada proliferação no grupo do óleo de semente de uva. Também foi observada intensa presença de crostas em ambos os grupos.

Aos 7 dias, o grupo controle apresentava predominância de discreta angiogênese, moderada presença de tecido de granulação, predominância de moderada deposição de colágeno, e predominância de intensa presença de crostas. No grupo uva aos 7 dias, foi observada predominância de moderada angiogênese, tecido de granulação e deposição de colágeno, e predominância de discreta presença de crostas.

No 14º dia após a lesão o grupo controle apresentava discreta angiogênese e tecido de granulação, e predominância de discreta deposição de colágeno, enquanto o grupo uva apresentava predominância de discreta angiogênese e predominância de moderada quantidade de tecido de granulação e deposição de colágeno. No 21º dia, ambos os grupos apresentaram deposição de colágeno de forma moderada. Observou-se epitelização avançada no 14º e 21º dia em ambos os grupos (Figura 7).

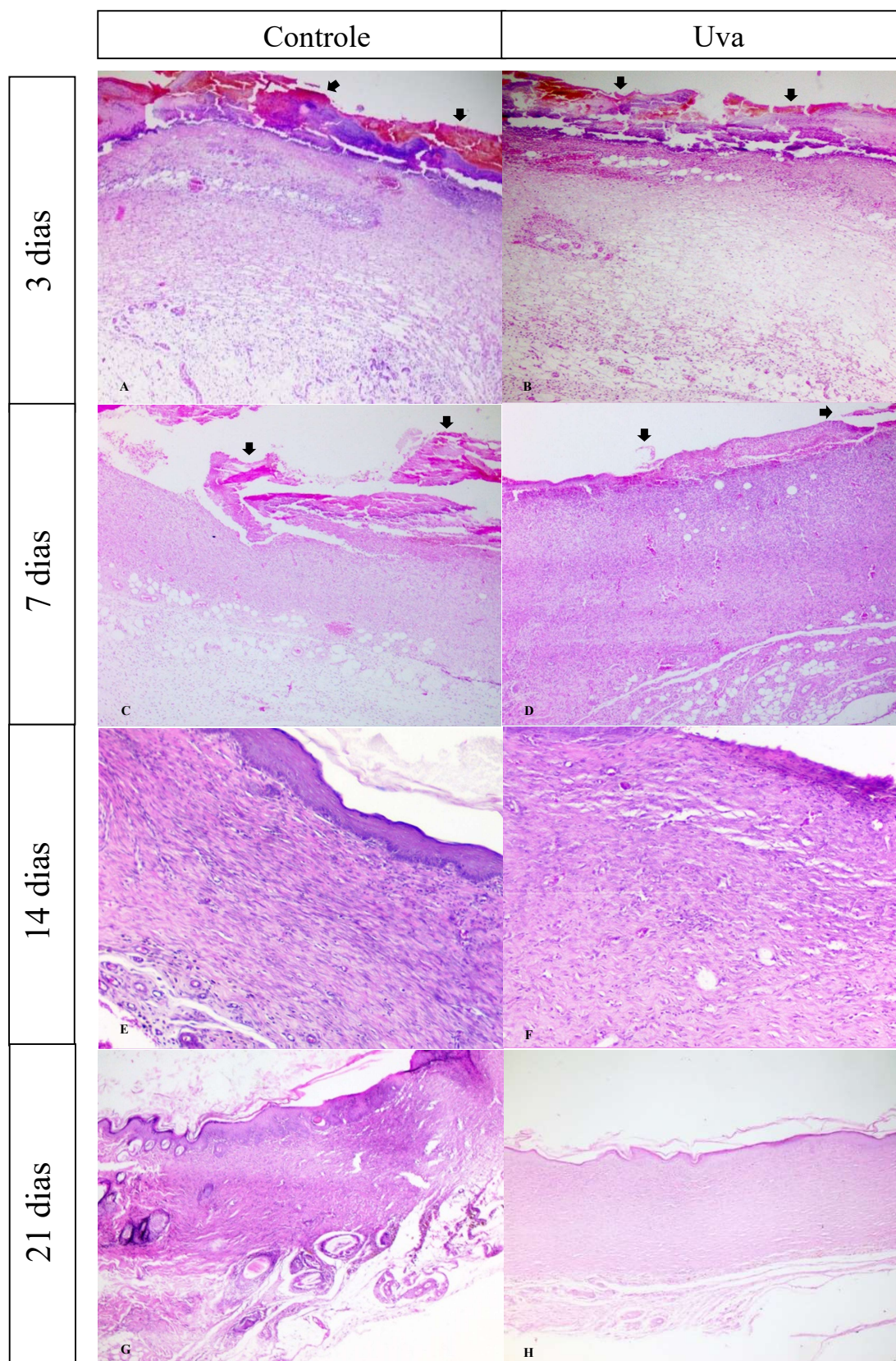


Figura 7 – Fotografia de cortes histológicos obtidos após realização de feridas experimentais em ratos não tratados (controle) e tratados com óleo de semente de uva (uva) aos 3, 7, 14 e 21 dias após a lesão. Observar presença de crostas (seta) no 3 e 7º dia (A, B, C e D); fibras colágenas no 14º dia (E e F); epitelização avançada no 21º dia (G e H). Hematoxilina e eosina. Aumento de 4x (A, B, C, D, G e H) e 10x (E e F).

Na avaliação histológica com HE, foi observado maior deposição de colágeno no grupo tratado com óleo de semente de uva no 14º dia quando comparado ao grupo controle no mesmo tempo de avaliação ($p<0,05$). Também foi obtido menor escore quanto a presença de crostas no grupo tratado com óleo de semente de uva no 7º dia quando comparado ao grupo controle no mesmo tempo de avaliação ($p<0,05$). Não houve diferença significativa entre os outros escores e tempos de avaliação (Tabela 6 e Figura 8).

Tabela 6 - Mediana e distância interquartilica dos escores obtidos na avaliação histológica com hematoxilina-eosina das feridas experimentais em ratos não tratados (controle) e tratados com óleo de semente de uva (uva) aos 3, 7, 14 e 21 dias após a lesão.

	Dia 3		Dia 7		Dia 14		Dia 21	
	Controle	Uva	Controle	Uva	Controle	Uva	Controle	Uva
Células inflamatórias	6,00 ^a (0)	4,00 ^a (2,00)	4,00 ^a (1,00)	4,00 ^a (1,00)	2,00 ^a (0,50)	2,00 ^a (0)	2,00 ^a (2,00)	2,00 ^a (2,00)
Epitelização	0 ^a (0)	0 ^a (0)	0 ^a (1,00)	0,50 ^a (1,00)	3,00 ^a (1,25)	2,00 ^a (1,25)	3,00 ^a (1,50)	3,00 ^a (0,25)
Angiogênese	4,00 ^a (2,00)	3,00 ^a (2,00)	2,00 ^a (2,00)	4,00 ^a (2,00)	2,00 ^a (0)	2,00 ^a (0,50)	2,00 ^a (0)	2,00 ^a (0)
Tecido de granulação	4,00 ^a (2,00)	4,00 ^a (0)	4,00 ^a (0)	4,00 ^a (0,50)	2,00 ^a (0,50)	3,00 ^a (4,00)	1,00 ^a (2,00)	2,00 ^a (2,00)
Deposição de colágeno	5,00 ^a (2,00)	4,00 ^a (0)	4,00 ^a (0,50)	4,00 ^a (1,00)	2,00 ^a (2,00)	4,00 ^b (2,00)	4,00 ^a (0)	4,00 ^a (0)
Presença de crostas	6,00 ^a (3,00)	6,00 ^a (2,75)	6,00 ^a (5,50)	1,50 ^b (2,00)	0 ^a (1,00)	0 ^a (0,50)	0 ^a (2,00)	0,50 ^a (1,00)

^aNas linhas – medianas com letra minúscula diferentes diferem pelo teste não paramétrico Mann-Whitney ($p<0,05$). Comparação entre animais não tratados (controle) e tratados com o óleo de semente de uva (uva) para cada tempo de avaliação.

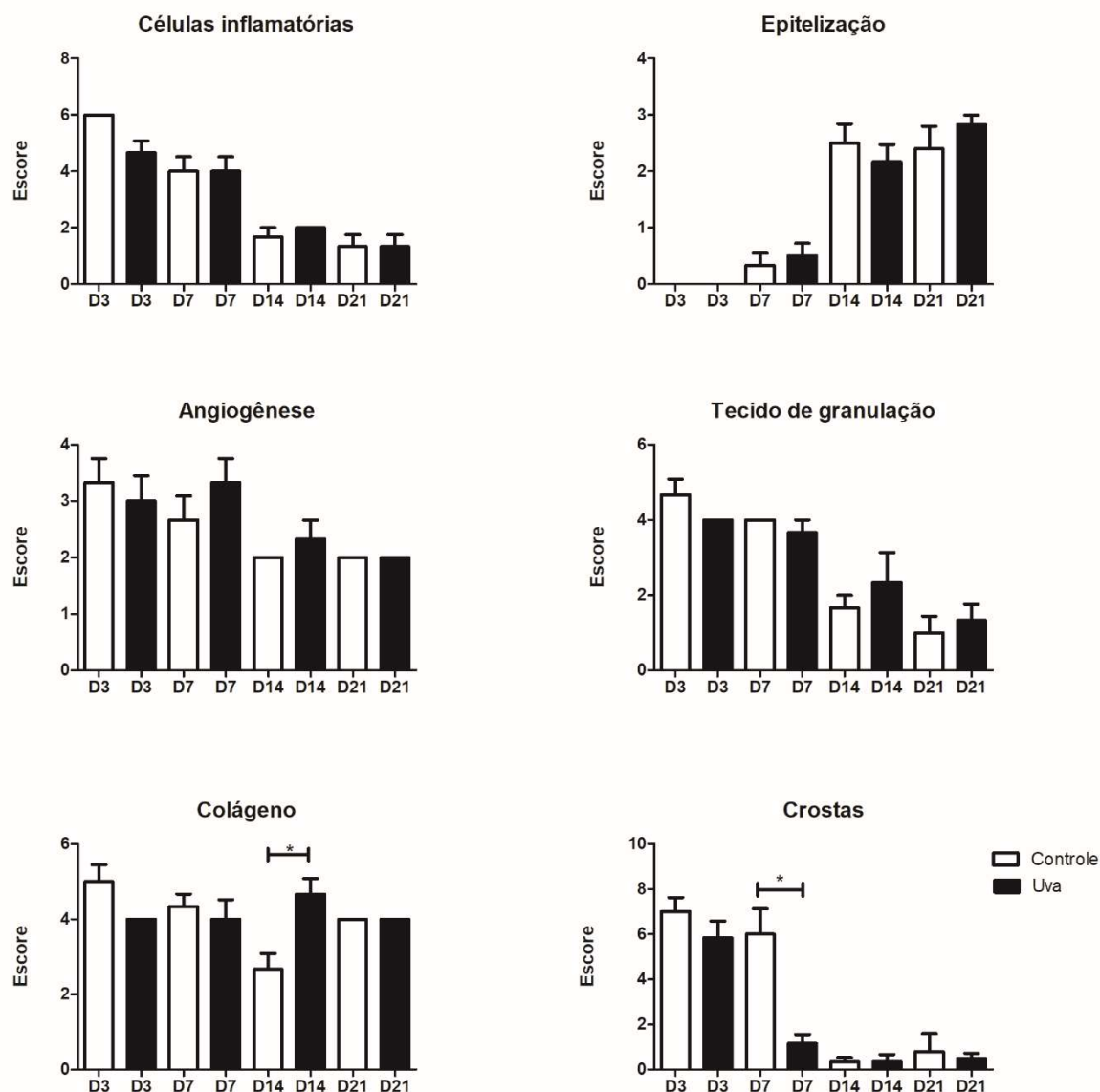


Figura 8 - Mediana e distância interquartílica dos escores obtidos na avaliação histológica com hematoxilina-eosina de feridas experimentais em ratos não tratados (controle) e tratados com óleo de semente de uva (uva) aos 3, 7, 14 e 21 dias após a lesão. * Diferem pelo teste não paramétrico Mann-Whitney ($p < 0,05$).

Aos 3 dias após a lesão, na avaliação histológica com o tricrômico de masson, foi observada discreta fibroplasia em ambos os grupos, controle e uva. Aos 7 dias, os dois grupos apresentaram predominância de moderada fibroplasia. No 14º após a lesão, o grupo controle apresentou predominância de intensa fibroplasia, enquanto o grupo uva apresentou predominância moderada. No 21º dia, ambos os grupos apresentaram intensa fibroplasia (Figura 9).

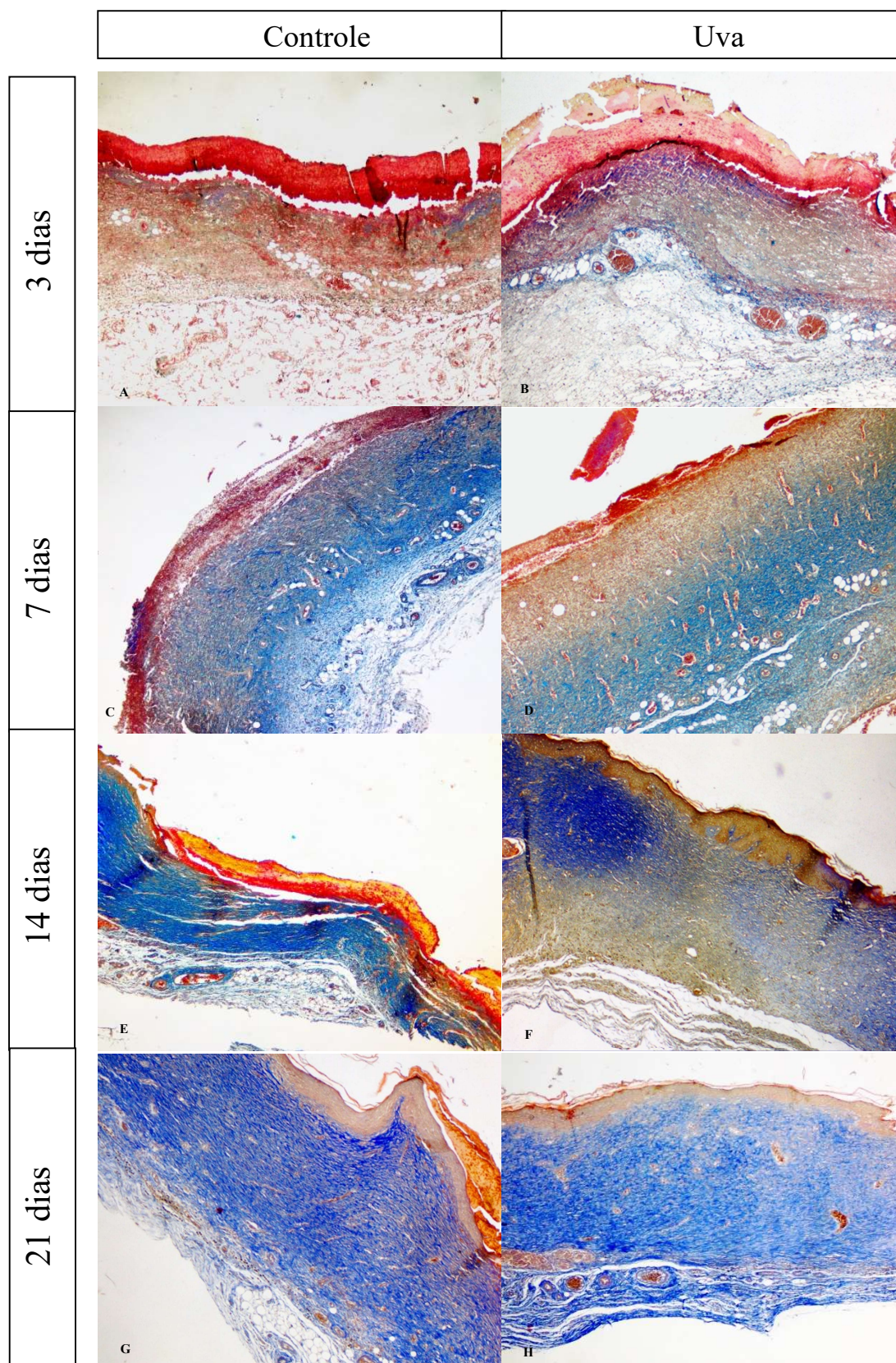


Figura 9 - Fotografia de cortes histológicos obtidos após realização de feridas experimentais em ratos não tratados (controle) e tratados com óleo de semente de uva (uva) aos 3, 7, 14 e 21 dias após a lesão. Observar fibras colágenas coradas em azul. Tricrômico de Masson. Aumento de 4x.

Não houve diferença significativa entre os grupos em todos os tempos de avaliação quanto ao escore de fibroplasia (Tabela 7 e Figura 10).

Tabela 7- Mediana e distância interquartílica dos escores obtidos na avaliação histológica com o tricrômico de masson das feridas experimentais em ratos não tratados (controle) e tratados com óleo de semente de uva (uva) aos 3, 7, 14 e 21 dias após a lesão.

	Dia 3		Dia 7		Dia 14		Dia 21	
	Controle	Uva	Controle	Uva	Controle	Uva	Controle	Uva
Fibroplasia	2,00 ^a (0)	2,00 ^a (0)	4,00 ^a (0,50)	4,00 ^a (0,50)	5,00 ^a (2,50)	4,00 ^a (0,50)	6,00 ^a (0)	6,00 ^a (0)

^aNas linhas – medianas com letra minúscula diferentes diferem pelo teste não paramétrico Mann-Whitney ($p < 0,05$). Comparação entre animais não tratados (controle) e tratados com o óleo de semente de uva (uva) para cada tempo de avaliação.

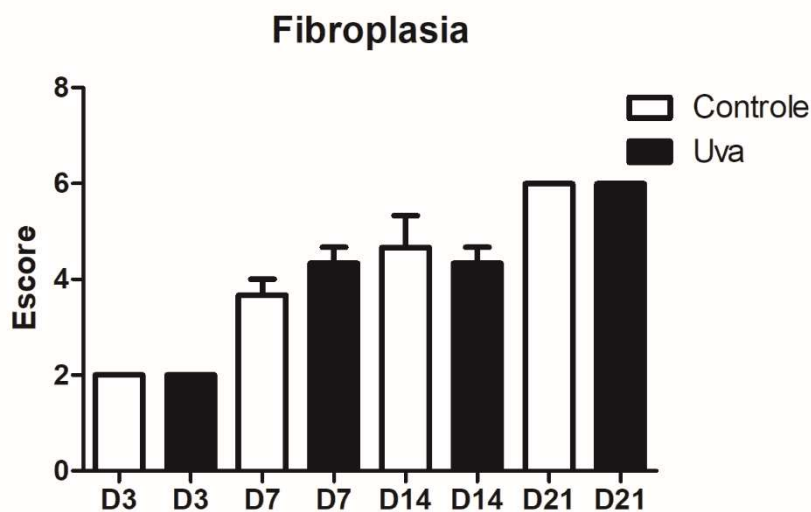


Figura 10 - Mediana e distância interquartílica dos escores obtidos na avaliação histológica com tricrômico de masson de feridas experimentais em ratos não tratados (controle) e tratados com óleo de semente de uva (uva) aos 3, 7, 14 e 21 dias após a lesão. *Diferem pelo teste não paramétrico Mann-Whitney ($p < 0,05$).

Na avaliação da área do colágeno, foi observada maior porcentagem no grupo tratado com óleo de semente de uva no 3º e 14º dia quando comparado ao grupo controle no mesmo tempo de avaliação ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa entre os outros tempos de avaliação (Tabela 8 e Figura 11).

Tabela 8 - Média e desvio padrão da área do colágeno (%) das feridas experimentais em ratos não tratados (controle) e tratados com óleo de semente de uva (uva) aos 3, 7, 14 e 21 dias após a lesão.

	Dia 3		Dia 7		Dia 14		Dia 21	
	Controle	Uva	Controle	Uva	Controle	Uva	Controle	Uva
Média ± (desvio padrão)	17,40 ^a (2,90)	27,58 ^b (8,57)	28,21 ^a (5,89)	30,85 ^a (3,99)	26,55 ^a (5,79)	36,56 ^b (7,76)	23,74 ^a (6,86)	29,23 ^a (3,24)

^aNas linhas – médias com letra minúscula diferentes diferem pelo teste T não pareado ($p < 0,05$). Comparação entre animais não tratados (controle) e tratados com o óleo de semente de uva (uva) para cada tempo de avaliação.

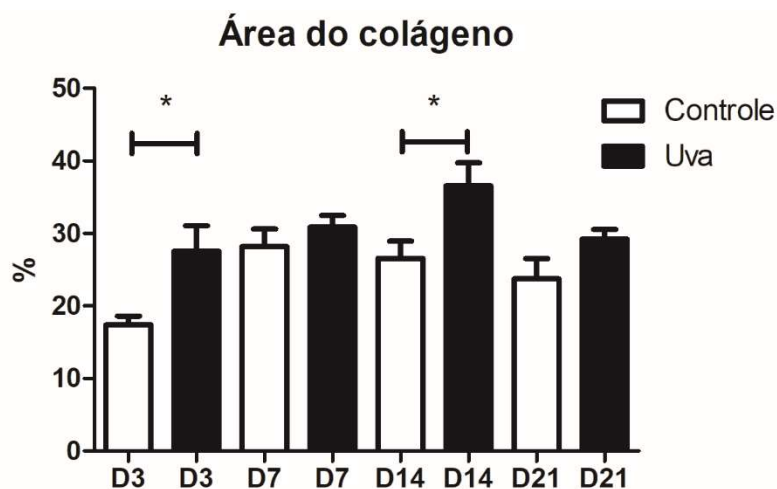


Figura 11 - Média e desvio padrão da área do colágeno (%) das feridas experimentais em ratos não tratados (controle) e tratados com óleo de semente de uva (uva) aos 3, 7, 14 e 21 dias após a lesão. * Diferem pelo teste T não pareado ($p < 0,05$).

Aos 3 dias após a lesão, na avaliação imuno-histoquímica, foi observado moderada imunomarcagem da proteína VEGF nos queratinócitos em ambos os grupos, controle e uva. Aos 7 dias, foi observada moderada imunomarcagem no grupo controle e acentuada no grupo uva. No 14º dia após a lesão observou-se discreta imunomarcagem no grupo controle e moderada no grupo uva (Figura 12).

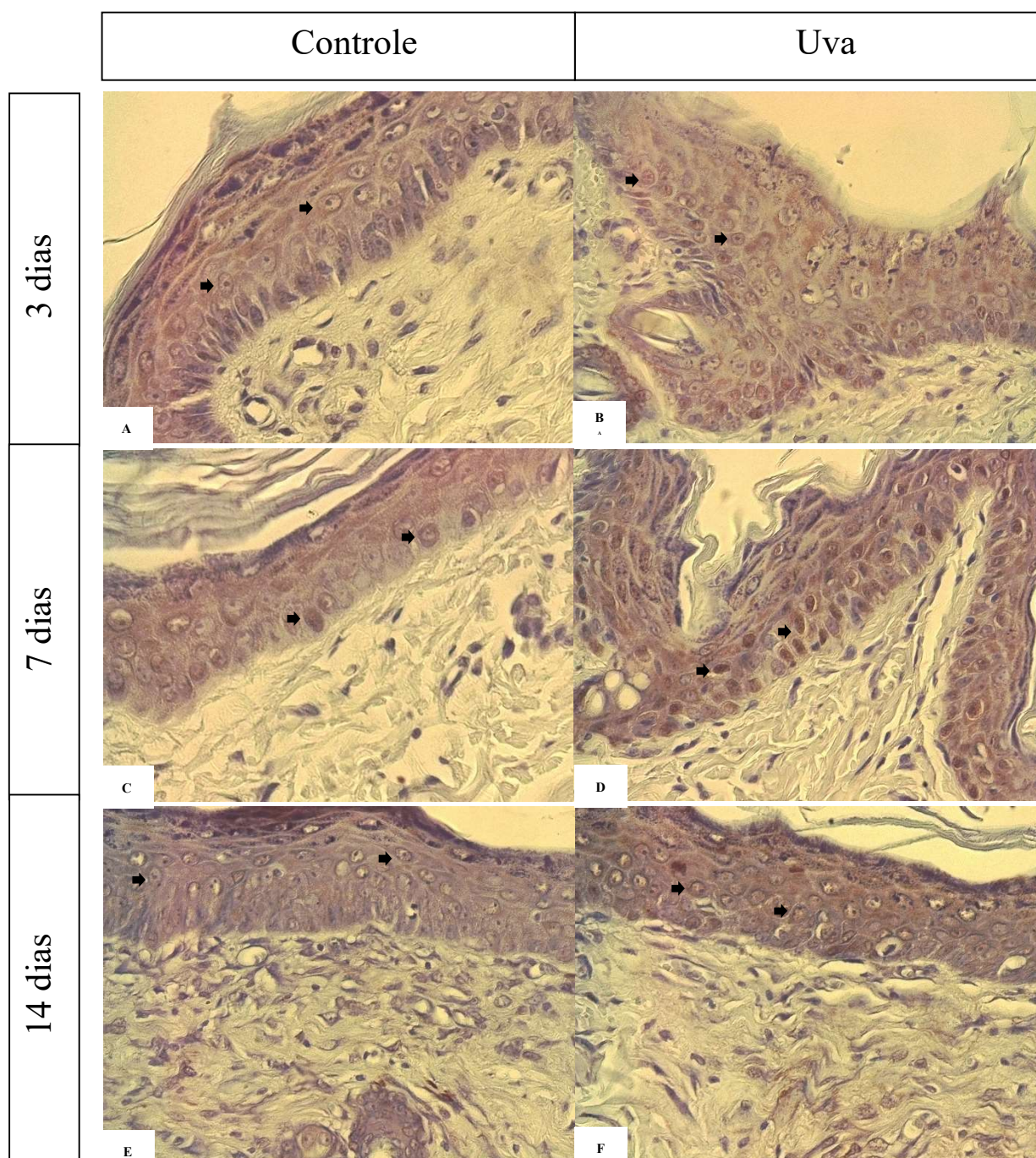


Figura 122 - Fotografia de cortes histológicos de feridas experimentais em ratos não tratados (controle) e tratados com óleo de semente de uva (uva) aos 3, 7 e 14 dias após a lesão, submetidos a marcação com anticorpo anti-VEGF. Observar imunomarcação da proteína nos queratinócitos (seta) de forma acentuada (D), moderada (A, B, C e F) e discreta (E). Hematoxilina e DAB. Aumento de 40x.

Aos 3 dias após a lesão, na avaliação imuno-histoquímica, foi observado moderada imunomarcação da proteína VEGF nas células endoteliais e células do tecido conjuntivo em ambos os grupos. Aos 7 dias, foi observada moderada imunomarcação no

grupo controle e acentuada no grupo uva. No 14º dia após a lesão observou-se discreta imunomarcção no grupo controle e moderada no grupo uva (Figura 13).

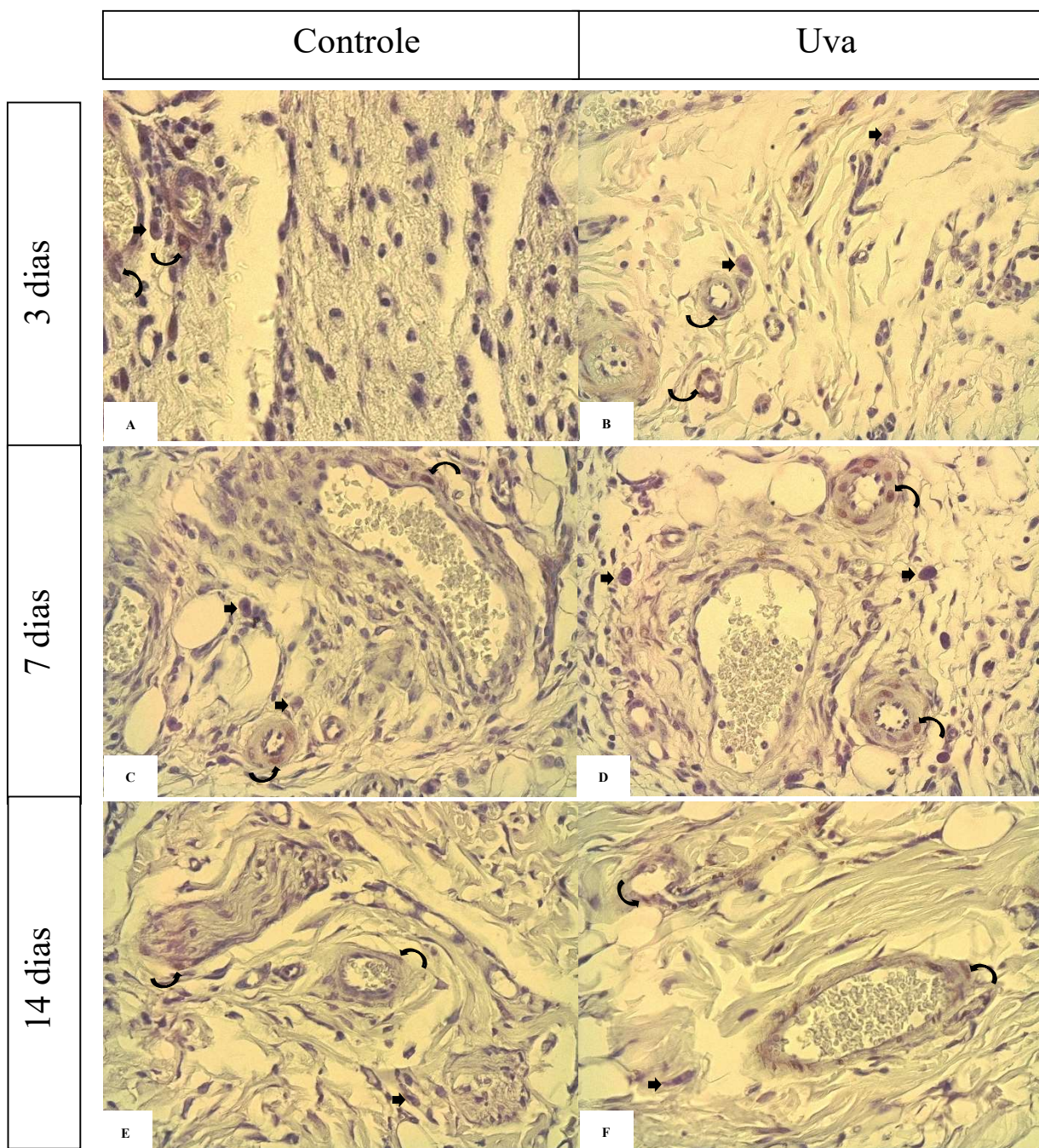


Figura 13 - Fotografia de cortes histológicos de feridas experimentais em ratos não tratados (controle) e tratados com óleo de semente de uva (uva) aos 3, 7 e 14 dias após a lesão, submetidos a marcação com anticorpo anti-VEGF. Observar imunomarcção da proteína nas células endoteliais (seta curva) e células do tecido conjuntivo (seta) de forma acentuada (D), moderada (A, B, C e F) e discreta (E). Hematoxilina e DAB. Aumento de 40x.

Na avaliação imuno-histoquímica, a densidade integrada de pixels referente a imunomarcagem para VEGF foi maior no grupo tratado com óleo de semente de uva no 7º dia quando comparado ao grupo controle no mesmo tempo de avaliação ($p < 0,05$). Não houve diferença na expressão de VEGF entre os grupos nos demais tempos de avaliação (Tabela 9 e Figura 14).

Tabela 9 - Média e desvio padrão da densidade integrada de pixels (milhões) do VEGF das feridas experimentais em ratos não tratados (controle) e tratados com óleo de semente de uva (uva) aos 3, 7 e 14 dias após a lesão.

	Dia 3 Controle	3 Uva	Dia 7 Controle	7 Uva	Dia 14 Controle	14 Uva
Média ± (desvio padrão)	112.0 ^a (5,37)	109.6 ^a (14,76)	103.9 ^a (6,87)	117.4 ^b (12,97)	81,0 ^a (22.44)	86.7 ^a (9.37)

^aNas linhas – médias com letra minúscula diferentes diferem pelo teste T não pareado ($p < 0,05$). Comparação entre animais não tratados (controle) e tratados com o óleo de semente de uva (uva) para cada tempo de avaliação.

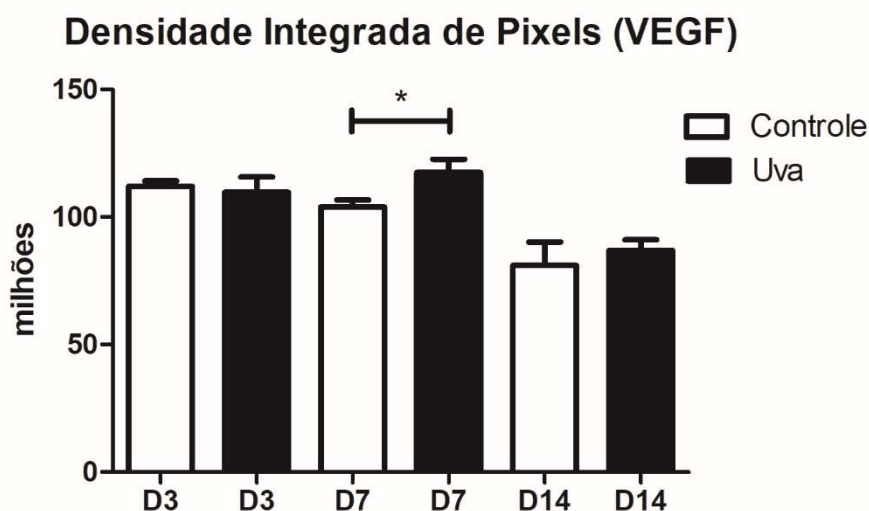


Figura 14 - Média e desvio padrão da densidade integrada de pixels (milhões) do VEGF das feridas experimentais em ratos não tratados (controle) e tratados com óleo de semente de uva (uva) aos 3, 7 e 14 dias após a lesão. * Diferem pelo teste T não pareado ($p < 0,05$).

Teste mecânico de tração

Durante o teste mecânico, a tensão das peles com lesão do grupo tratado com óleo de semente de uva foi maior quando comparada com as peles com lesão do grupo controle no mesmo tempo de avaliação ($p<0,05$). Também foi obtida maior tensão das peles íntegras em ambos os grupos, controle e uva, quando comparou-se com a tensão das peles com lesão dentro do mesmo grupo no tempo de avaliação ($p<0,05$) (Tabela 10 e Figura 15).

Tabela 10 - Média e desvio padrão da tensão (MPa) das peles íntegras e com lesão em amostras cutâneas após reparação de feridas experimentais em ratos não tratados (controle) e tratados com óleo de semente de uva (uva) no 21º dia após a lesão através do teste mecânico de tração.

	Controle	Uva
Com lesão	0,42 ^{aA} (±0,12)	0,84 ^{bA} (±0,10)
Pele íntegra	7,46 ^{aB} (±0,91)	7,95 ^{aB} (±1,00)

^aNas linhas – médias com letra minúscula diferentes diferem pelo teste T não pareado ($p<0,05$). Comparação entre animais não tratados (controle) e tratados com o óleo de semente de uva (uva) no 21º dia após a confecção das lesões.

^ANas colunas – médias com letra maiúscula diferentes diferem pelo teste T pareado ($p<0,05$). Comparação dentro do mesmo grupo para animais não tratados (controle) e tratados com o óleo de semente de uva (uva) no 21º dia após a confecção das lesões.

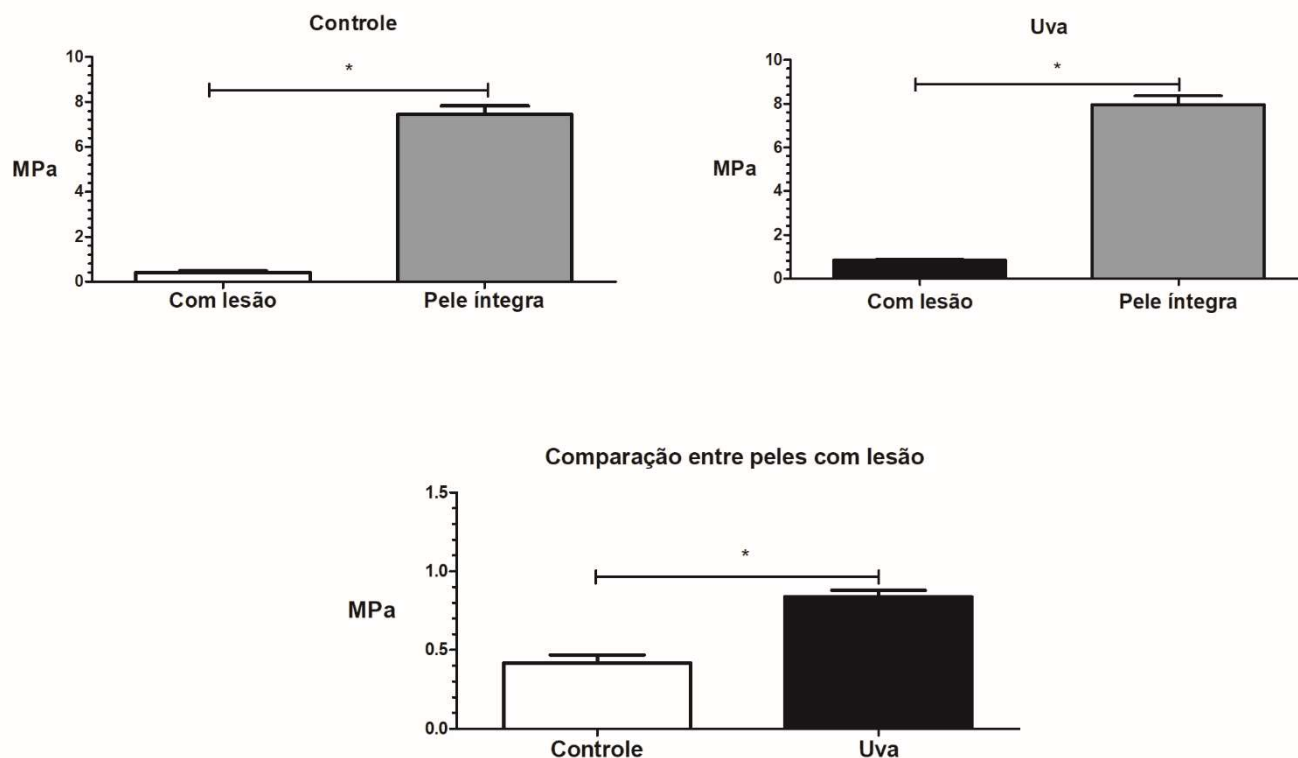


Figura 15 - Média e desvio padrão da tensão (MPa) das peles íntegras e com lesão em amostras cutâneas após reparação de feridas experimentais em ratos não tratados (controle) e tratados com óleo de semente de uva (uva) no 21º dia após a lesão através do teste mecânico de tração. * Diferem pelo teste T pareado e não pareado ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO

As feridas confeccionadas no presente estudo se caracterizaram como limpas, através de procedimento cirúrgico asséptico, com formato circular de 12 mm de diâmetro, com o intuito de cicatrizarem por segunda intenção. De acordo com MacPhail (2015), o tratamento por segunda intenção geralmente envolve o uso de bandagens, pois promovem a limpeza e controle do ferimento, reduzem a formação de exsudatos, eliminam espaço morto e mantêm o ferimento úmido, melhorando a cicatrização. O presente estudo não fez uso de qualquer bandagem ou curativo, e dessa forma os resultados poderiam ter sido diferentes, já que o curativo auxiliaria em um maior tempo de contato do óleo de semente de uva com a ferida, além de seus benefícios individuais descritos acima.

Os tempos de avaliação foram escolhidos de acordo com as etapas do processo de cicatrização. De acordo com Broughton *et al.* (2006), a fase inflamatória tem início imediato após a injúria tecidual, se prolongando por 6 dias; já a fase proliferativa se estende do 4º ao 14º dia após a lesão; e a fase de remodelamento se inicia no 8º dia após

a injúria tecidual, permanecendo por até um ano. Dessa forma, obteve-se no presente estudo um tempo de avaliação dentro da fase inflamatória (3º dia), e dois tempos de avaliação nas fases de proliferação (7º e 14º dia) e remodelamento (14º e 21º dia).

O menor escore de crostas observado na análise macroscópica e histológica do grupo do óleo de semente de uva no 7º dia de avaliação pode ser atribuído à característica oleosa do óleo, auxiliando na remoção das crostas do grupo uva entre o 3º e 7º dia. Adicionalmente, a ação anti-inflamatória dos componentes do óleo, descrita por Santangelo *et al.* (2007), Vieira *et al.* (2008) e Shinagawa *et al.* (2015), pode ter auxiliado na diminuição da produção de exsudato durante a fase inflamatória da cicatrização, beneficiando o escore de crostas. Outro fator que pode ter beneficiado a menor produção de exsudato pelo grupo tratado com o óleo é a ação impermeabilizante dos taninos presentes na semente da uva quando usados no tratamento de feridas, reportado por Monteiro *et al.* (2005).

Ainda no escore de crostas, é importante ressaltar que mesmo com ausência de diferença significativa, houve um aumento da mediana no escore do grupo controle do 3º para o 7º dia. Esse resultado pode estar relacionado com uma extensão da fase inflamatória no grupo controle, e isso não foi visualizado no grupo uva, visto que as propriedades anti-inflamatórias do óleo não permitiram que isso acontecesse.

Os escores de coloração do leito e epiteliação estão associados. A coloração avermelhada das feridas do 3º e 7º dia estavam correlacionadas à presença de crostas e posteriormente, ao tecido de granulação. A coloração rosada presente a partir do 14º dia estava associada a ausência do tecido de granulação, e consequente cicatrização.

Embora não houve diferença significativa, esperava-se que a avaliação macroscópica e histológica de epiteliação fosse superior no grupo uva de acordo com os estudos de Sakagani *et al.* (1992) apud Kolodziej *et al.* (1994, p.410) e Rekik *et al.* (2016). Esses autores relataram em seus trabalhos a habilidade das proantocianidinas em estimular os monócitos, que posteriormente se tornam macrófagos, e dos esteróis em estimular macrófagos e aumentarem a produção dos fibroblastos. Com isso, acrescido do trabalho de Broughton *et al.* (2006) que discorrem sobre os macrófagos e fibroblastos sintetizarem o EGF, TGF-alfa, KGF-1 e KGF-2, haveria a estimulação dos queratinócitos, principais células da reepiteliação, a se proliferarem em um novo epitélio e acelerar o tempo de epiteliação no grupo uva.

A menor área da ferida em ambos os grupos no 7º, 14º e 21º dia de avaliação, quando comparado com o dia 0, entra em concordância com o trabalho de Broughton *et*

al. (2006), que discorrem sobre a fase proliferativa se iniciar, na maioria das vezes, após o 4º dia da indução da lesão, permeando os eventos de contração e epitelização da ferida que auxiliam na redução de sua área.

Embora não houve diferença significativa no resultado do potencial de contração, esperava-se que este fosse superior no grupo uva. Novamente a ação das proantocianidinas e esteróis na estimulação dos fibroblastos e macrófagos, descritos por Sakagani *et al.* (1992) apud Kolodziej *et al.* (1994, p.410) e Rekik *et al.* (2016) poderiam auxiliar nesse resultado, já que os macrófagos sintetizam TGF-beta, fator transformador dos fibroblastos em miofibroblastos, que realizam a contração da ferida, relatado no trabalho de Broughton *et al.* (2006).

A presença de grande quantidade de ácidos graxos no óleo de semente de uva também poderia contribuir para melhorar o resultado do potencial de contração no grupo uva, já que atuam como barreira na redução da perda de água pela pele, reportado por Hatanaka e Curi (2007). Esse fator poderia ter auxiliado na manutenção da homeostase no leito lesado, obtendo melhores resultados na diminuição da área da ferida do grupo uva. Isso foi observado por Cardoso *et al.* (2004) em animais tratados topicamente com ácidos graxos, principalmente com ácido oleico e linoleico, obtendo redução significativa da área do ferimento a partir do 5º dia da confecção da lesão.

No presente estudo houve contração da ferida no 3º dia após a indução das lesões. Isso foi descrito por Velnar *et al.* (2009), indicando que a fase de proliferação pode, eventualmente, se iniciar no terceiro dia após a lesão tecidual.

Em relação ao resultado histológico de células inflamatórias, esperava-se que este fosse significativamente inferior no grupo uva, devido às características antioxidante e anti-inflamatória dos compostos fenólicos presentes na semente da uva. De acordo com o estudo de Soto *et al.* (2015), principalmente através da ação das proantocianidinas, o óleo de semente de uva reduz EROs, eliminam radicais livres, previnem a peroxidação lipídica e inibem a formação de citocinas pró-inflamatórias; além disso, os compostos lipofílicos também controlam a produção e liberação excessiva de citocinas e mediadores inflamatórios, reportado por Hatanaka e Curi (2007) e Shinagawa *et al.* (2015). Todos esses fatores poderiam levar a uma diminuição das células inflamatórias no grupo uva, porém esse resultado não foi visualizado.

Ainda na análise de células inflamatórias, esperava-se um aumento significativo na contagem de células do grupo uva no 14º dia de avaliação, já que o óleo de semente

de uva possui componentes que estimulam a proliferação de macrófagos, já reportado por Rekik *et al.* (2016).

Em relação à avaliação histológica da epitelização, a ausência de diferença significativa reforça os dados obtidos anteriormente, já que também não foi observado diferença estatística entre os grupos e tempos de avaliação no que se refere aos escores de epitelização da análise macroscópica, área da ferida e potencial de contração.

De acordo com Tazima *et al.* (2008), o tecido de granulação é composto por novos vasos sanguíneos, fibroblastos, macrófagos e um frouxo arranjo de colágeno. Dessa maneira, o escore de tecido de granulação do grupo uva poderia ser significativamente superior no 14º dia de avaliação, já que esse resultado foi visualizado no escore de colágeno. Mas isso não ocorreu no presente estudo, podendo levar em consideração os demais fatores que influenciam a formação do tecido de granulação, como as células inflamatórias e angiogênese, que também não obtiveram alterações significativas na análise histológica.

A maior área de colágeno no 3º e 14º dia de avaliação, juntamente com o maior escore de deposição de colágeno no 14º dia na análise histológica do grupo uva pode ser explicado pelo trabalho de Castellan *et al.* (2010), que relataram a habilidade das proantocianidinas em aumentarem a atividade de hidroxilação da prolina, uma importante etapa na biossíntese do colágeno, ampliando sua produção.

Nayak *et al.* (2010, 2011) relataram o aumento do aminoácido hidroxiprolina, produto da hidroxilação da prolina, em grupos de animais tratados com Cabernet Sauvignon, uma variante da uva comum (*Vitis vinifera*), e com o óleo de semente de uva, respectivamente, indicando aumento da produção de colágeno em ambas ocasiões, o que está de acordo com os achados do presente estudo.

Além da ação da prolina, a estimulação dos fibroblastos e macrófagos pelos esteróis, relatado por Rekik *et al.* (2016), podem contribuir para esse aumento, já que Broughton *et al.* (2006) mostraram que os fibroblastos sintetizam colágeno pelo estímulo do PDGF, EGF e FGF secretado por macrófagos e plaquetas.

A propriedade do óleo de semente de uva em estimular colágeno e células produtoras de fatores de colágeno pode ter acelerado sua deposição já no 3º dia de avaliação, e também pode estar associada com as principais fases de desenvolvimento do colágeno no processo cicatricial, sendo eles a proliferação e remodelamento. Isso pode explicar porque houve diferença significativa no 3º e 14º dia de avaliação no grupo uva.

A ausência de diferença significativa no resultado do escore de fibroplasia na análise com o tricrômico de massom pode estar relacionado ao método usado durante as avaliações. A avaliação histológica foi realizada de forma subjetiva, mesmo com a criação dos escores, por um único avaliador. Já a análise da área do colágeno foi realizada através de um software de imagem, e devido a isso, os resultados podem ter se apresentado de forma diferente. Essa mesma discrepância ocorreu entre os resultados da angiogênese, visto que houve diferença significativa no 7º dia de avaliação na análise imuno-histoquímica, e isso não foi confirmado na histologia.

A maior expressão de VEGF na avaliação imuno-histoquímica no 7º dia no grupo tratado com óleo de semente de uva pode ser atribuído às características antioxidantes e antimicrobianas do óleo, acrescido da estimulação de células do tecido conjuntivo. Em um estudo realizado por Hemmati *et al.* (2015) utilizando o extrato de semente de uva na cicatrização de feridas em humanos, foi proposto que as proantocianidinas podem acelerar a cicatrização, estimulando o processo da angiogênese por desencadear a produção do VEGF. Esse assunto já havia sido elucidado por Khanna *et al.* (2001, 2002), com o uso do extrato de semente de uva em humanos e animais, respectivamente, conteúdo proantocianidina e trans-resveratrol, facilitando a indução do VEGF pelos queratinócitos, por regular o controle transcricional da expressão da proteína através de indução oxidativa.

Khanna *et al.* (2002) afirmaram que mesmo que o óleo de semente de uva possua características antioxidantes, pode-se considerar que as modificações produzidas por seus compostos são capazes de gerar a formação de outros oxidantes, entrando em concordância com a regulação do VEGF através da indução oxidativa.

De acordo com Broughton *et al.* (2006), os macrófagos e fibroblastos também secretam o VEGF. O aumento desse fator de crescimento no grupo uva pode ter sido ocasionado pela estimulação dos macrófagos e fibroblastos induzido pelos esteróis presentes no óleo de semente de uva, já descrito por Rekik *et al.* (2016).

A ação antimicrobiana do óleo, principalmente contra *Staphylococcus aureus* (ROTAVA *et al.*, 2009), também pode ter contribuído para o aumento na expressão do VEGF observada no presente estudo. Essa suposição se baseia no estudo realizado por Khodaparast *et al.* (2003), relatando que a expressão dessa proteína diminuiu entre os dias 0 e 7 na presença do *S. aureus* após confecção de fratura na tíbia de cães. Quando se comparou com focos de fratura não infectados, estes obtiveram aumento na expressão do

VEGF do dia 0 ao dia 7, entrando em concordância com o dia da avaliação imuno-histoquímica que foi encontrada a diferença significativa.

A maior tensão das peles íntegras no grupo controle e uva quando comparadas com as peles lesionadas, dentro do mesmo grupo no teste mecânico de tração, pode ser explicado por MacPhail (2015), que relatou sobre o ganho de força do ferimento de apenas 20% durante as 3 primeiras semanas após a lesão.

O aumento da tensão das peles com lesão do grupo uva quando comparado com o grupo controle durante o teste mecânico, pode ser atribuído às proantocianidinas, por terem a capacidade de estabilizar colágeno e elastina, melhorando a flexibilidade e elasticidade da pele, já descrito por Baumann (2007) e Graf (2010), atribuindo às feridas uma maior capacidade de resistência durante o teste.

Outra propriedade das proantocianidinas que levaram a uma maior resistência das peles com lesão do grupo uva é a sua característica de ligação cruzada (*cross-link*) com o colágeno, descrito no estudo de Shavandi *et al.* (2008). Nesse mesmo estudo é relatado que a formação de ligações cruzadas naturais em qualquer tecido biológico providencia maior força e resistência a qualquer tipo de degradação. Essa ligação cruzada pode ser explicada pela descoberta de Hagerman e Butler (1981), que relataram sobre a alta afinidade dos taninos (proantocianidinas) por grandes concentrações de prolina, aminoácido presente na biossíntese do colágeno.

Green *et al.* (2010) e Garcia *et al.* (2021) demonstraram os benefícios da ligação cruzada entre as proantocianidinas e o colágeno na resistência à biodegradação, em interfaces odontológicas, e na estabilidade e resistência em armações (*scaffolds*) para regeneração óssea, respectivamente, o que está de acordo com os achados do presente estudo durante a avaliação do teste mecânico.

A ação antioxidante do óleo de semente de uva também pode ter beneficiado o resultado do teste mecânico de tração. Corroborando para essa afirmação, Lucarini *et al.* (2019) relataram o efeito da catequina na proteção da prolina contra oxidação, evitando que componentes oxidativos se aproximem da molécula de colágeno. O estudo foi realizado com o colágeno tipo I, que é mais resistente que o colágeno tipo III e encontrado na fase de remodelamento do processo cicatricial (KONDO; ISHIDA, 2010), entrando em concordância com a análise do teste mecânico ao 21º dia após a lesão. Além de atuarem na proteção contra oxidação, Madhan *et al.* (2005) relataram que as catequinas também auxiliam na estabilização do colágeno.

É importante ressaltar que os fatores relacionados ao colágeno que beneficiaram o resultado do teste mecânico de tração, possivelmente influenciaram o resultado histológico do escore e área do colágeno, e vice-versa. Acrescido a isso, os resultados obtidos nesse estudo eventualmente podem ser atribuídos a um sinergismo entre os diversos componentes presentes no óleo de semente de uva.

CONCLUSÃO

O óleo de semente de uva reduziu a formação de crostas nas feridas no 7º dia após a indução das lesões, aumentou a deposição de colágeno no 3º e 14º dia, colaborou para a maior expressão de VEGF no 7º dia de avaliação, além de aumentar a resistência a tensão do tecido reparado no 21º dia após as lesões. Nas condições em que foi realizado este estudo, pode-se concluir que o óleo de semente de uva favoreceu a reparação tecidual de feridas cutâneas experimentais em ratos.

REFERÊNCIAS

- ABE, L. T.; MOTA, R. V.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. **Food Science and Technology**, v.27, n.2, p.394-400, 2007.
- AL BAYATI, A. J.; ENAAD, D. F. Histopathological Study and Surgery the Effect of Grape Seed Oil on Wound Healing in Rabbits. **International Journal of Science and Research**, v.6, n.14, p.959-962, 2013.
- BAUMANN, L. S. Less-known botanical cosmeceuticals. **Dermatologic Therapy**, v.20, n.5, p.330–342, 2007.
- BROUGHTON, G.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. The Basic Science of Wound Healing. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v.117, n.75, p.12-34, 2006.
- CARDOSO, C. R. B.; SOUZA, M. A.; FERRO, E. A. V.; FAVORETO JÚNIOR, S.; PENA, J. D. O. Influence of topical administration of n-3 and n-6 essential and n-9 nonessential fatty acids on the healing of cutaneous wounds. **Wound Repair Regen** v.12, n.2, p.235-243, 2004.
- CASTELLAN, C. S.; PEREIRA, P. N. R.; VIANA, G.; CHEN, S. N.; PAULI, G. F.; BEDRAN-RUSSO, A. K. Solubility study of phytochemical cross-linking agents on dentin stiffness. **Journal of Dentistry**, v.38, n.5, p.431–436, 2010.
- FITZMAURICE, S. D.; SIVAMANI, R. K.; ISSEROFF, R. R. Antioxidant Therapies for Wound Healing: A Clinical Guide to Currently Commercially Available Products. **Skin Pharmacology and Physiology**, v.24, n.3, p.113-126, 2011
- GARAVAGLIA, J.; MARKOSKI, M. M.; OLIVEIRA, A.; MARCADENTI, A. Grape Seed Oil Compounds: Biological and Chemical Actions for Health. **Nutrition and Metabolic Insights**, v.9, p.59–64, 2016.
- GARCIA, C. F.; MARANGON, C. A.; MASSIMINO, L. C.; KLINGBEIL, M. F. G.; MSRTINS, V. C. A.; PLEPIS, A. M. de G. Development of collagen/nanohydroxyapatite scaffolds containing plant extract intended for bone regeneration. **Materials Science and Engineering: C**, v.123, p.1-12, 2021.
- GRAF, J. Antioxidants and Skin Care: The Essentials. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v.125, n.1, p.378–383, 2010.
- GRECA, F. H.; BIONDO-SIMÕES, M. L. P.; DE PAULA, J. B.; NORONHA, L.; CUNHA, L. S. F.; BAGGIO, P. V.; BITTENCOURT, F. O. Correlação entre o fluxo sanguíneo intestinal e a cicatrização de anastomoses colônicas: estudo experimental em cães. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.15, p.88-94, 2000.

GRENN, B.; YAO, X.; GANGULY, A.; XU, C.; DUSEVICH, V.; WALKER, M. P.; WANG, Y. Grape seed proanthocyanidins increase collagen biodegradation resistance in the dentin/adhesive interface when included in an adhesive. **Journal of Dentistry**, v.38, n.11, p.908–915, 2010.

HAGERMAN, A. E.; BUTLER, L. G. The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. **Journal of Biological Chemistry**, v.256, n.9, p.4494–4497, 1981.

HATANAKA, E.; CURI, R. Ácidos graxos e cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.88, n.2, p.53-58, 2007.

HEMMATI, A. A.; FOROOZAN, M.; HOUSHMAND, G.; MOOSAVI, Z. B.; BAHADORAM, M.; MARAM, N. S. The Topical Effect of Grape Seed Extract 2% Cream on Surgery Wound Healing. **Global Journal of Health Science**, v.7, n.2, p.52-58, 2015

KHANNA, S.; ROY, S.; BAGCHI, D.; BAGCHI, M.; SEN, C. K. Upregulation of Oxidant-Induced VEGF Expression in Cultured Keratinocytes by a Grape Seed Proanthocyanidin Extract. **Free Radical Biology & Medicine**, v.31, n.1, p. 38–42, 2001.

KHANNA, S.; VENOJARVI, M.; ROY, S.; SHARMA, N.; TRIKHA, P.; BAGCHI, D.; BAGCHI, M.; SEN, C. K. Dermal wound healing properties of redox-active grape seed proanthocyanidins. **Free Radical Biology and Medicine**, v.33, n.8, p.1089–1096, 2002.

KHODAPARAST, O.; COBERLY, D. M.; MATHEY, J.; ROHRICH, R. J.; LEVIN, L. S.; BROWN, S. A. Effect of a Transpositional Muscle Flap on VEGF mRNA Expression in a Canine Fracture Model. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v.112, n.1, p.171–176, 2003.

KHURANA, S.; VENKATARAMAN, K.; HOLLINGSWORTH, A.; PICHE, M.; TAI, T. C. Polyphenols: Benefits to the Cardiovascular System in Health and in Aging. **Nutrients**, v.5, n.10, p.3779-3827, 2013.

KOŁODZIEJ, H.; HABERLAND, C.; WOERDENBAG, H. J.; KONINGS, A. W. T. Moderate cytotoxicity of proanthocyanidins to human tumour cell lines. **Phytotherapy Research**, v.9, n.6, p.410–415, 1995.

KONDO, T.; ISHIDA, Y. Molecular pathology of wound healing. **Forensic Science International**, v.203, p.93-98, 2010

KRISHNA, P. L.; KOSMEDER, J. W.; PEZZUTO, J. M. Biological Effects of Resveratrol. **Antioxidantes & Redox Signaling**, v.3, n.6, p.1041-1064, 2001.

LUCARINI, M.; SCIUBBA, F.; CAPITANI, D.; DI COCCO, M. E.; D'EVOLI, L.; DURAZZO, A.; DELFINI, M.; BOCCIA, G. L. Role of catechin on collagen type I stability upon oxidation: a NMR approach. **Natural Product Research**, v.34, n.1, p.53–62, 2019.

LUTTERODT, H.; SLAVIN, M.; WHENT, M.; TURNER, E.; YU, L. Fatty acid composition, oxidative stability, antioxidant and antiproliferative properties of selected cold-pressed grape seed oils and flours. **Food Chemistry**, v.128, n.2, p.391–399, 2011.

MACPHAIL, C. M. Cirurgia do Sistema Tegumentar. In: FOSSUM, T. W. **Cirurgia de Pequenos Animais**. 4 ed. Elsevier Editora Ltda, 2015, p.546-596.

MADHAN, B.; SUBRAMANIAN, V.; RAO, J. R.; NAIR, B. U.; RAMASAMI, T. Stabilization of collagen using plant polyphenol: Role of catechin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.37, n.1-2, p.47–53, 2005.

MIDDLETON, E. Effect of Plant Flavonoids on Immune and Inflammatory Cell Function. In: MANTHEY, J. A.; BUSLIG, B. S. **Flavonoids in the Living System**, Springer, 1998, p.175-182.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. L.; AMORIM, E. L. C. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química nova**, v.28, n.5, p.892-896, 2005.

NAYAK, B. S.; RAMDATH, D. D.; MARSHALL, J.R.; ISITOR, G. N.; EVERSLEY, M.; XUE, S.; SHI, J. Wound-healing Activity of the Skin of the Common Grape (*Vitis Vinifera*) Variant, Cabernet Sauvignon. **Phytotherapy Research**, v.24, p.1151–1157, 2010.

NAYAK, B. S.; RAMDATH, D. D.; MARSHALL, J. R.; ISITOR, G.; XUE, S.; SHI, J. Wound-healing Properties of the Oils of *Vitis vinifera* and *Vaccinium macrocarpon*. **Phytotherapy Research**, v.25, p.1201–1208, 2011.

OLIVEIRA, S. T.; LEME, M. C.; PIPPI, N. L.; RAISER, A. G. Formulações de confrei (*Symphytum officinale* L.) na cicatrização de feridas cutâneas de ratos. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, v.7/8, n.1, p.65-74, 2000.

PRIEUR, C.; RIGAUD, J.; CHEYNIER, V.; MOUTOUNET, M. Oligmeric and polymeric procyanidins from grape seeds. **Phytochemistry**, v.36, p.781–784, 1994.

REKIK, D. M.; KHEDIR, S. B.; MOALLA, K. K.; KAMMOUN, N. G.; REBAI, T.; SAHNOUN, Z. Evaluation of Wound Healing Properties of Grape Seed, Sesame, and Fenugreek Oils. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p.1-12, 2016.

ROMBAUT, N.; SAVOIRE, R.; THOMASSET, B.; CASTELLO, J. Optimization of oil yield and oil total phenolic content during grape seed cold screw pressing. **Industrial Crops and Product**, v, 63, p.26–33, 2015.

ROTAVA, R.; ZANELLA, I.; DA SILVA, L. P.; MANFRON, M. P.; CERON, C. S.; ALVES, S. H.; KARKOW, A. K.; SANTOS, J. P. A. Atividade antibacteriana, antioxidante e tanante de subprodutos da uva. **Ciência Rural**, v.39, n.3, p.941-944, 2009.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: FEP/MVZ, 1998, 211p.

SANTANGELO, C.; VARI, R.; SCAZZOCCHIO, B.; DI BENEDETTO, R.; FILESÌ, C.; MASELLA, R. Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanità**, v.43, n.4, p.394–405, 2007.

SANTOS, L. O. M.; SIMÕES, M. L. P. B.; MACHADO, A. P. B.; MATIOSKI FILHO, G. R.; ENDO, P. C.; GRUEN, G. R.; CIPRIANI, V. R.; MESQUITA, L. D. Efeito da Somatotropina Sobre A Cicatrização de Feridas Cutâneas em Ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.17, n.4, p.220-224, 2002.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. Radicais Livres de Oxigênio e Exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v.10, n.4, p.308-313, 2004.

SHAVANDI, A.; BEKHIT, A E. D. A.; SAEEDI, P.; IZADIFAR, Z.; BEKHIT, A. A.; KHADEMHOSEINI, A. Polyphenol uses in biomaterials engineering. **Biomaterials**, v.167, p.91–106, 2018.

SHI, J.; YU, J.; POHORLY, J. E.; KAKUDA, Y. Polyphenolics in Grape Seeds—Biochemistry and Functionality. **Journal of Medicinal Food**, v.6, n.4, p.291-299, 2003.

SHINAGAWA, F. B.; SANTANA, F. C.; TORRES, L. R. O.; MANCINI-FILHO, J. Grape seed oil: a potential functional food? **Food Science and Technology**, v.35, n.3, p.399–406, 2015.

SOTO, M.; FALQUÉ, E.; DOMÍNGUEZ, H. Relevance of Natural Phenolics from Grape and Derivative Products in the Formulation of Cosmetics. **Cosmetics**, v.2, n.3, p.259–276, 2015.

SUBRAMANIAN, M.; GOSWAMI, M.; CHAKRABORTY, S.; JAWALI, N. Resveratrol induced inhibition of Escherichia coli proceeds via membrane oxidation and independent of diffusible reactive oxygen species generation. **Redox Biology**, v.2, p.865-872, 2014.

TAZIMA, M. F. G. S.; VICENTE, Y. A. M. V. A.; MORIYA, T. Biologia da Ferida e Cicatrização. **Medicina**, v.41, n.3, p.259-264, 2008.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbial Mechanisms of Pathogenicity. *In: Microbiology: an introduction*. 10 ed. Ed. Pearson, 2010, p. 810.

TROST, K.; KLANCNIK, A.; VODOPIVEC, B. M.; LEMUT, M. S.; NOVSAK, K. J.; PETER RASPOR, P.; MOZINA, S. S. Polyphenol, antioxidant and antimicrobial potential of six different white and red wine grape processing leftovers. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.96, n.14, p.4809–4820, 2016.

VELNAR, T.; BAILEY, T.; SMRKOLJ, V. The Wound Healing Process: an Overview of the Cellular and Molecular Mechanism. **The Journal of International Medical Research**, v.37, n.5, p.1528-1542, 2009.

VIEIRA, A. P.; SANTOS, N. R.; BORGES, M. P. A. V.; SCHMITZ, W. O. Ação dos flavonóides na cicatrização por segunda intenção em feridas limpas induzidas cirurgicamente em ratos Wistar. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 29, n. 1, p. 65-74, 2008.

XIA, E. Q.; DENG, G. F.; GUO, Y. J.; LI, H. B. Biological activities of polyphenols from grapes. **International Journal of Molecular Sciences**, v.11, n.2, p.622–646, 2010.

ANEXO I

Comitê de Ética em Experimentação Animal



Ofício CEEA-007/2021

Uberaba, 18 de junho de 2021

Ilma. Prof^a**Isabel Rodrigues Rosado**

Assunto: Encaminha processo nº 007/2021, sobre o protocolo de projeto de pesquisa "Efeito do óleo de semente da uva (*vitis vinífera*) na cicatrização de ferida em ratos".

Prezado (a) Professor(a),

Em resposta a sua solicitação, informo que o protocolo acima referido foi submetido a avaliação do CEEA-UNIUBE, em reunião no dia 11/06/2021, sendo considerado **aprovado**.

Atenciosamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Josely F. Bittar'.

Profa. Josely F. Figueiredo Bittar

Coordenadora do CEEA-UNIUBE

ANEXO II

Protocolo de Histologia

- 1. Desparafinização:**
 - Lâminas imersas em xilol 3x por 5 minutos;
- 2. Hidratação:**
 - Lâminas imersas em álcool 100% 3x por 5 minutos;
 - Lâminas imersas em álcool 95% 1x por 5 minutos;
 - Lavar em água corrente por 5 minutos;
- 3. Coloração:**
 - Imersão em hematoxilina por 50 segundos;
 - Lavar em água corrente por 5 minutos;
 - Imersão em eosina por 50 segundos;
- 4. Desidratação:**
 - Lâminas imersas em álcool 100% 3x por 5 minutos;
 - Lâminas imersas em xilol 3x por 5 minutos;
- 5. Montagem:**
 - Montar as lâminas com lamínulas usando resina sintética.

ANEXO III

Protocolo de Imuno-histoquímica

1. Desparafinização:

- Lâminas mantidas em estufa a 55° por 24 h;
- Lâminas imersas em xilol 3x por 3 minutos;

2. Hidratação:

- Lâminas imersas em álcool 100% 2x por 3 minutos;
- Lâminas imersas em álcool 95% 2x por 3 minutos;
- Lâminas imersas em PBS por 5 minutos;

3. Bloqueio de peroxidases endógenas e proteínas inespecíficas:

- Secar ao redor dos cortes para retirar o excesso de solução;
- Lâminas imersas em solução de peróxido de hidrogênio (3%) e metanol absoluto por 10 minutos em temperatura ambiente;
- Lavagem em PBS 3x por 5 minutos;
- Lâminas imersas em leite em pó desnatado Molico® (Nestlé, Brasil) a 3% diluído em água destilada por 60 minutos em temperatura ambiente;
- Lavagem em PBS 3x por 5 minutos;

4. Anticorpo primário:

- Secar ao redor dos cortes para retirar o excesso de solução;
- Após diluição do anticorpo, aplicar duas gotas para cada corte da lâmina;
- Incubar por 18 horas a 4°C;
- Lavagem em PBS 3x por 5 minutos;

5. Anticorpo secundário:

- Secar ao redor dos cortes para retirar o excesso de solução;
- Aplicar duas gotas do Histofine® (Nichirei Biosciences Inc., JP) para cada corte da lâmina;
- Incubar em temperatura ambiente por 30 minuto;
- Lavagem em PBS 3x por 5 minutos;

6. DAB:

- Secar ao redor dos cortes para retirar o excesso de solução;
- Diluir uma gota do DAB Chromogen® (ScyTek Laboratories, EUA) em 1 mL de diluente;

- Aplicar duas gotas da diluição para cada corte da lâmina;
 - Incubar em temperatura ambiente por 5 minutos;
 - Lavagem em água destilada 3x por 5 minutos;
- 7. Contracoloração:**
- Imersão em hematoxilina de Harris por 20 segundos;
 - Lavar em água corrente por 5 minutos;
- 8. Desidratação:**
- Lâminas imersas em álcool 95% 2x por 3 minutos;
 - Lâminas imersas em álcool 100% 2x por 3 minutos;
 - Lâminas imersas em xilol 3x por 3 minutos;
- 9. Montagem:**
- Montar as lâminas com lamínulas usando resina sintética.

ANEXO IV

Protocolo de preparo PBS 1% (pH 7,6) – 1 litro

1. Em um Becker, colocar 500 ml de água destilada;
2. Dissolver nos 500 ml com o auxílio de um agitador magnético:
 - 7,75g de cloreto de sódio (NaCl)
 - 1,50g de fosfato dipotássico (K_2HPO_4)
 - 0,20g de fosfato monopotássico (KH_2PO_4)
3. Após a diluição de todos os sais, completar com água destilada até atingir 1.000 ml;
4. Com o auxílio do medidor de pH, corrigir o pH da solução para 7,6, adicionando ácido clorídrico (HCl) quando básica, ou hidróxido de sódio (NaOH) quando ácida;
5. Transferir para frasco âmbar;
6. Armazenar a 4°C.

Notas:

- i. Dentro de alguns dias, quando eficientemente preparada, a solução formará cristais no fundo do frasco.
- ii. Para utilização, descristalize a solução por imersão do frasco em água a temperatura ambiente ou em banho-maria a 30°C.